

Glória Elisa Florido Mendes

Gravidez e nefrotoxicidade causada pela
ciclosporina A: um estudo experimental

São José do Rio Preto

2005

Glória Elisa Florido Mendes

Gravidez e nefrotoxicidade causada pela
ciclosporina A: um estudo experimental

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do título de Doutor no Curso de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Eixo Temático: Medicina e Ciências
Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

São José do Rio Preto

2005

Mendes, Glória Elisa Florido

Gravidez e nefrotoxicidade causada pela ciclosporina A:
um estudo experimental / Glória Elisa Florido Mendes

São José do Rio Preto, 2005

79p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do
Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

1. Nefrotoxicidade; 2. Ciclosporina A; 3. Gravidez; 4. Ratos.

- ✓ Ao meu amor e amigo Marcos Barrochelo, pelo carinho e compreensão.
- ✓ Aos meus pais, Bolivar e Glória, pelo amor dedicado aos filhos, pelo exemplo de dignidade e de amor a Deus.
- ✓ Aos meus irmãos, Maria Francisca e Luís Emídio, que com muito carinho sempre cuidaram de mim, e pela união em Cristo Jesus.
- ✓ Aos meus queridos enteados Adair e Bruno pelo carinho com que me receberam em suas vidas e meus amados sobrinhos Tatiana, Thiago, Carlos Henrique e Beatriz, pelo carinho e amor que sempre nos uniram.
- ✓ Às queridas amigas Meg e Gladys pelo amor que nos unem.

Agradecimentos Especiais

- ✓ Ao Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann meu orientador e amigo. Coordenador dedicado da Pós-graduação, exemplo de pesquisador e médico. Incentivador do trabalho experimental, profissionalismo na orientação para a realização dos trabalhos no laboratório de Fisiopatologia Renal, agradeço por tantas coisas que aprendi sob sua orientação, obrigada pela confiança, pelo apoio e consideração.

- ✓ Ao Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, Coordenador Geral da Pós-graduação da FAMERP, sempre me incentivando na pós-graduação e na pesquisa, obrigada pela atenção e carinho.

Agradecimentos

- ✓ À Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, pelo carinho que me recebeu no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelo apoio e colaboração na realização da técnica de imunohistoquímica deste trabalho.

- ✓ Aos queridos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Renal da FAMERP: Francine Zocoler de Mendonça, Dr. Ivan Mello Araújo, Dra. Rosa Maria C. Soubhia, Dra. Alejandra L. Walder Sosa, Profa. Cleuzenir Toschi Gomes Barbieri, Carla Patrícia Carlos, Sandra Mara de Oliveira, Sueli Aparecida Alves, Rui Vicente Lucato Jr, Meire Pinheiro, André R. Miquelin, Fernanda Camêlo, obrigada pelo carinho, pelo sentimento de colaboração que existe em nossa convivência, por transformarmos o laboratório um ambiente amável, alegre e ao mesmo tempo com responsabilidade e seriedade; uma extensão de nossas vidas. Obrigada também pela tolerância.

- ✓ Ao Biotério da FAMERP, no fornecimento dos animais, ao veterinário responsável, Prof. Dr. João Vicente de Paiva Netto. Obrigado aos queridos amigos do Biotério, Pedro José de Freitas, responsável técnico, com quem aprendi muitas técnicas em relação ao manuseio adequado dos animais e pelo sentimento de colaboração entre os setores; aos funcionários, Edna Maria Gracioli, Luzia da Silva Viana, Florentino Damaceno de Oliveira, Walter Camarin, Rosângela Amaral G. Souza, Idalina F. M da Silveira e ao Prof. Dr. José Liberato F. Caboclo, obrigada

a todos, pela amizade que sempre nos uniu, fazendo a convivência diária ser uma grande alegria.

- ✓ Aos queridos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, pela amizade, companheirismo, pelo incondicional apoio entre os laboratórios, Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes, Eduardo Carvalho Lira, Flávia Aparecida Graça e Dawit Gonçalves.
- ✓ À querida amiga Profa. Ana Cláudia Polli Lopes, pelo apoio incondicional, pelo carinho e atenção com que sempre me atendeu nos momentos difíceis e de desânimo; pelas palavras de sabedoria e ponderação, seu apoio foi especial e valoroso.
- ✓ À Profa. Dra. Maria Alice Sperto Baptista, pela amizade e colaboração na análise anatomopatológica.
- ✓ À querida amiga e funcionária da pós-graduação, Rosimeire Cleide Souza Desidério, pelo apoio na realização deste trabalho, pela agradável convivência diária e pela amizade.
- ✓ Aos queridos amigos e funcionários da pós-graduação, Fabiana Cristina Godoy, José Antonio Silistino, Guilherme Martins Dias e Carlos Rodrigo da Silva Viana, pelo convívio amigo e atenção em todos os momentos.
- ✓ Ao Luiz Henrique Ferreira e Edílson Solim, pelo apoio nas questões de informática deste trabalho.

- ✓ Ao amigo Alessandro Catelan Rodrigues Martins, pelo apoio em momentos especiais na realização deste trabalho; e às amigas Carla Renata Graça e Adriana Cristina Ambrózio, pelo apoio, carinho e amizade sempre presente.
- ✓ Aos queridos amigos Marcus Alexandre Mendes Luz e Rodrigo Estevan Imperial, pela amizade e apoio em momentos especiais.
- ✓ À Profa. Dra. Cristiane Damas Gil e aos funcionários do Laboratório de Histotecnologia, Domingos Zanchetta Netto, Zanclayr Alves Santana; ao Prof. Dr. Jorge Alberto Thomé, pelo apoio e colaboração na confecção das lâminas.
- ✓ Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.
- ✓ Ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pelo apoio e colaboração.
- ✓ A todos os que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho.
- ✓ A Deus, por tudo.

A todos, minha gratidão.

*Inclina o teu ouvido, e ouve as palavras dos sábios, e aplica o teu coração à
minha ciência.*

*Porque é coisa suave, se as guardares no teu coração, se as aplicares todas
aos teus lábios.*

*Para que a tua confiança esteja no SENHOR, a ti tas faço saber hoje, sim, a ti
mesmo.*

Provérbios 22: 17-19

Figura 1.	Filtração glomerular renal (FGR), depuração de inulina após 10 dias de tratamento.....	34
Figura 2.	Filtração glomerular renal (FGR), depuração de inulina após 20 dias de tratamento.....	34
Figura 3.	Fluxo sanguíneo renal (FSR) após 10 dias de tratamento.....	35
Figura 4.	Fluxo sanguíneo renal (FSR) após 20 dias de tratamento.....	35
Figura 5.	Resistência vascular renal (RVR) após 10 dias de tratamento..	36
Figura 6.	Resistência vascular renal (RVR) após 20 dias de tratamento..	36
Figura 7.	Pressão arterial média (PAM) após 10 dias de tratamento.....	37
Figura 8.	Pressão arterial média (PAM) após 20 dias de tratamento.....	37
Figura 9.	Concentrações de CsA no sangue materno (SCsA) após 10 dias de tratamento.....	38
Figura 10.	Concentrações de CsA no sangue materno (SCsA) após 20 dias de tratamento.....	38
Figura 11.	Análise do óxido nítrico urinário (NO) de ratas após 10 dias de tratamento.....	43
Figura 12.	Análise histológica após 20 dias de tratamento.....	44
Figura 13.	Número de células All positivas por área de $0,245\mu\text{m}^2$ do interstício do córtex renal, após 10 dias de tratamento.....	46
Figura 14.	Número de células All positivas por área de $0,245\mu\text{m}^2$ do interstício do córtex renal, após 20 dias de tratamento.....	46

Figura 15. Número de células All positivas por área de $0,245\mu\text{m}^2$ em arteríolas aferentes do córtex renal, após 10 dias de tratamento.....	47
Figura 16. Número de células All positivas por área de $0,245\mu\text{m}^2$ em arteríolas aferentes do córtex renal, após 20 dias de tratamento.....	47
Figura 17. Imuno-localização de All no interstício do córtex renal de ratas virgens que receberam CsA por 20 dias de tratamento	48
Figura 18. Imuno-localização de All no interstício do córtex renal de ratas virgens que receberam veículo por 20 dias de tratamento.....	48
Figura 19. Imuno-localização de All no interstício do córtex renal de ratas prenhes que receberam CsA por 20 dias de tratamento.....	49
Figura 20. Imuno-localização de All no interstício do córtex renal de ratas prenhes que receberam veículo por 20 dias de tratamento.....	49
Figura 21. Imuno-localização de All nas arteríolas aferentes no córtex renal de ratas virgens que receberam CsA por 20 dias de tratamento.....	50
Figura 22. Imuno-localização de All nas arteríolas aferentes no córtex renal de ratas prenhes que receberam CsA por 20 dias de tratamento.....	50

Tabela 1. Comparação entre grupos dos dados de filtração glomerular renal (FGR), fluxo sanguíneo renal (FSR), pressão arterial média (PAM), resistência vascular renal (RVR) e concentração sanguínea de CsA (SCsA)	39
Tabela 2. Comparação entre grupos dos dados de sódio urinário (UNa), fração de excreção de sódio (FeNa), osmolalidade urinária (Uosm), depuração osmolar (COsm) e volume urinário (VU).....	42

Abreviaturas e Siglas

%	-	Porcentagem
μl	-	Microlitro
μmol/mgCr	-	Micromol por miligrama de creatinina
A II	-	Angiotensina II
ANOVA	-	Análise de variância
BCsA	-	Blood levels of cyclosporin
BP	-	Blood pressure
C	-	Controle
Ccr	-	Clearance de creatinina
Ccr	-	Depuração de creatinina
CGRP	-	Calcitonin gene-related peptide
COsm	-	Depuração osmolar
CsA	-	Ciclosporina A
ECA	-	Enzima conversora de angiotensina
FeNa	-	Fração de excreção de sódio
FGR	-	Filtração glomerular renal
FI	-	Fibrose intersticial
FSR	-	Fluxo sanguíneo renal
G	-	Prenhez ou gravidez

g	- Grama
G/C	- Prenhe ou grávida tratada com veículo
G/CsA	- Prenhe ou grávida tratada com ciclosporina A
GFR	- Renal glomerular filtration
HE	- Hematoxilina-eosina
IF	- Interstitial fibrosis
IL-2	- Interleucina 2
InsP3	- Trifosfato de inositol
mEq/l	- Miliequivalente por litro
mg/dl	- Miligrama por decilitro
mmHg	- Milímetro de mercúrio
NFTA	- Fator nuclear dos linfócito T ativado
ng	- Nanograma
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Sintase de óxido nítrico
NS	- Não estatisticamente significativa
PAM	- Pressão arterial média
PAMS	- Ácido periódico prata metanamina
PAS	- Ácido periódico reativo de Schiff
Pcr	- Creatinina plasmática

RBF	- Renal blood flow
RVR	- Resistência vascular renal
RVR	- Renal vascular resistance
SCsA	- Ciclosporina A no sangue
SRA	- Sistema renina angiotensina
TGF- β	- Fator β transformador do crescimento
UNa	- Excreção urinária de sódio
UNO	- Óxido nítrico urinário
Uosm	- Osmolalidade urinária
UV	- Urinary volum
V	- Virgens
V/C	- Virgem tratada com veículo
V/CsA	- Virgem tratada com ciclosporina A
VU	- Volume urinário

A ciclosporina A (CsA) é uma droga imunossupressora cujo efeito tóxico mais grave é a nefrotoxicidade, caracterizada pela queda da filtração glomerular e pelo desenvolvimento de fibrose intersticial renal irreversível. A CsA pode passar através da placenta para o feto em desenvolvimento. Atualmente, um grande número de mulheres em idade fértil são tratadas com CsA, aumentando a chance de gestação sob efeito desta droga. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da CsA sobre a função e estrutura renal durante a gravidez. Utilizou-se o modelo da manobra de restrição de sal na dieta (0,06%) em ratas Munich-Wistar, virgens que receberam CsA (V/CsA), grávidas com CsA (G/CsA), virgens com veículo (V/C) e grávidas com veículo (G/C), na dose de 15 mg/Kg/dia de CsA subcutâneo ou veículo. Avaliou-se na metade e no final do período gestacional (21 dias) a filtração glomerular (FGR, depuração de inulina, ml/min/100g), o fluxo sanguíneo renal (FSR, ultra-som Doppler, ml/min), a resistência vascular renal (RVR, mmHg/ml/min), a pressão arterial média (PAM, cateter intracarotídeo, mmHg), os níveis sanguíneos de CsA (SCsA, radioimunoensaio, ng/ml), o volume urinário (VU, µl/min), a creatinina plasmática e urinária (mg/dl), a excreção urinária de sódio (UNa, mEq/l), a fração de excreção de sódio (FeNa,%), a osmolalidade urinária (Uosm, m/Osm/K), a depuração osmolar (Cosm, ml/min), o óxido nítrico urinário (NO, griess, µmol/mgCr), a imunohistoquímica para células renais positivas para angiotensina II (células/campo) e a histologia renal. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão e comparados por ANOVA e Student-Neuman-Keuls. Após 10 dias de tratamento a gravidez provocou aumentos

significantes de 27% na FGR (GC; $1,19 \pm 0,04$ vs $0,94 \pm 0,05$ em V/C, $p < 0,05$) e de 36% no FSR (G/C; $4,9 \pm 0,2$ vs $3,6 \pm 0,1$ em V/C, $p < 0,001$) e quedas significantes de 13% na PAM (GC; 112 ± 4 vs 129 ± 5 em V/C, $p < 0,05$) e de 29% na RVR (GC; 24 ± 1 vs 34 ± 2 em VC, $p < 0,05$) dos animais tratados com veículo. Em contraste, nos animais tratados com CsA, na gravidez não houve aumento significativo da FGR (20%, G/CsA; $0,95 \pm 0,07$ vs $0,79 \pm 0,07$ em V/CsA, $p > 0,05$) ou queda significativa da PAM (7%, G/CsA; 110 ± 3 vs 118 ± 4 em V/CsA, $p > 0,05$). Neste grupo manteve-se a elevação significativa do FSR (38%, G/CsA; $3,3 \pm 0,2$ vs $2,4 \pm 0,1$ em V/CsA $p < 0,01$) e a diminuição significativa da RVR (24%, G/CsA 38 ± 3 vs 50 ± 3 em V/CsA, $p < 0,05$). A gravidez provocou diminuição significativa dos níveis séricos de CsA (G/CsA; 544 ± 58 vs 805 ± 71 em V/CsA, $p < 0,01$). Os animais tratados com CsA apresentaram tendência a níveis mais elevados de óxido nítrico urinário, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Não houve diferença de óxido nítrico urinário entre ratas virgens e grávidas. A gravidez causou aumento do número de células positivas para angiotensina II no interstício renal ($3,9 \pm 0,6$ em G/CsA vs $2,5 \pm 0,4$ em V/CsA e $4 \pm 1,4$ em G/C vs $1,9 \pm 0,86$ em V/C), porém estas diferenças não alcançaram significância estatística. O número de células positivas para angiotensina II na arteríola aferente foi maior nas ratas grávidas quando comparadas às virgens (G/C; $1,3 \pm 0,3$ vs $0,21 \pm 0,2$ em V/C) e maior nas ratas virgens tratadas com CsA quando comparadas às tratadas com veículo (V/CsA; $1 \pm 0,3$ vs $0,21 \pm 0,2$ em V/C), porém, estas diferenças não foram estatisticamente significantes. Após 20 dias, V e G apresentaram

queda similares (NS) na FGR e FSR, sendo CsA vs Controle para FGR ($p < 0.001$), para FSR ($p < 0.01$), e aumento similar na RVR (NS). Os valores da PAM apresentaram quedas similares, em V vs G (NS) e diminuição nos animais com CsA vs C ($p < 0,05$). A SCsA foi menor em G vs V ($p < 0,01$). A expressão de All no interstício aumentou, para V/CsA vs V/C ($p < 0,001$) e para G/CsA vs G/C ($p < 0,05$). O mesmo aconteceu na arteríola aferente, para V/CsA vs V/C ($p < 0,01$); todavia não foi estatisticamente significante para as ratas prenhes. Apenas o grupo V/CsA após 20 dias apresentou escore de $0,2 \pm 0,1$ de IRF. A CsA alterou desfavoravelmente a hemodinâmica renal na metade da gravidez normal, prejudicando o aumento da FGR e prejudicando queda da PA na prenhez normal, apesar de as ratas prenhes apresentarem níveis sanguíneos da droga menores em relação às virgens. O NO não parece estar envolvido nesse fenômeno. A expressão da All no interstício e na arteríola aferente foi maior para os animais com CsA e prenhes vs controles. A gravidez não prejudicou a fibrose intersticial causada pela CsA.

Palavras-Chave: 1. Nefrotoxicidade; 2. Ciclosporina A; 3. Gravidez; 4. Ratos

Abstract

Cyclosporine A (CsA) is a immunosuppressant drug, whose most serious toxic effect is chronic nephrotoxicity, characterized by decreased glomerular filtration rate and the development of irreversible renal fibrosis. It may go through the placenta to the developing fetus. Currently, a great number of women with childbearing potential is treated by CsA, increasing the chances of pregnancy under the effect of this drug. Our objectives were to assess CsA effects on the renal structure and function during pregnancy. The low-salt-diet (0.06%) model was used in pregnant (P/CsA) and virgin (V/CsA) Munich-Wistar female rats receiving CsA; in virgin (V/VH) and pregnant (P/VH) rats with vehicle at a dosage of 15 mg/kg/day of CsA subcutaneously or vehicle. Glomerular filtration rate (GFR, ml/min/100g) , renal blood flow (RBF, Doppler ultrasound, ml/min), renal vascular resistance (RVR, mmHg/ml/min), blood pressure (BP, intracarotid probe, mmHg), blood levels of CsA (BCsA, radioimmunoassay, ng/ml), urinary volume (UV, μ l/min), plasma and urinary creatinine (mg/dl), urine sodium excretion (UNa, mEq/l), sodium excretion fraction (FeNa,%) urinary osmolality (UOsm, m/Osm/K), osmolar clearance (COsm, ml/min), urinary nitric-oxide (NO, griess, μ mol/mgCr), immunohistochemistry for angiotensin II-positive renal cells and renal histology were measured in the middle and at the end of the gestational period (21 days). Results are presented as mean \pm standard error of mean and analyzed by ANOVA and Student-Neuman-Keuls test. After 10 days of treatment, the pregnancy caused significant increases of 27% in the GFR (G/C; 1.19 ± 0.04 vs 0.94 ± 0.05 in V/C, $p < 0.05$) and of 36% in RBF (G/C; 4.9 ± 0.2 vs 3.6 ± 0.1 in

V/C, $p < 0.001$) and significant decreases of 13% in MBP (GC; 112 ± 4 vs 129 ± 5 in V/C, $p < 0.05$) and of 29% in RVR (GC; 24 ± 1 vs 34 ± 2 in VC, $p < 0.05$) of vehicle treated animals. In contrast, in CsA-treated animals, there was no significant GFR increase in pregnancy (20%, G/CsA; 0.95 ± 0.07 vs 0.79 ± 0.07 in V/CsA, $p > 0.05$) nor was there a significant MPB decrease (7%, G/CsA; 110 ± 3 vs 118 ± 4 in V/CsA, $p > 0.05$). The significant RBF increase (38%, G/CsA; 3.3 ± 0.2 vs 2.4 ± 0.1 in V/CsA $p < 0.01$) and significant RVR decrease (24%, G/CsA 38 ± 3 vs 50 ± 3 in V/CsA, $p < 0.05$) were maintained in this group. Pregnancy caused a significant decrease of CsA serum levels (G/CsA; 544 ± 58 vs 805 ± 71 in V/CsA, $p < 0.01$). CsA treated animals showed a trend to higher urinary nitric oxide levels, however, the difference was not statistically significant. There was no difference in urinary nitric oxide between virgin and pregnant rats. Pregnancy increased the number of angiotensin II-positive cells in the renal interstitium (3.9 ± 0.6 in G/CsA vs 2.5 ± 0.4 in V/CsA and 4 ± 1.4 in G/C vs 1.9 ± 0.86 in V/C), however these differences did not reach statistical significance. The number of angiotensin II-positive cells in the afferent arteriole was greater in pregnant rats when compared to virgin rats (G/C; 1.3 ± 0.3 vs 0.21 ± 0.2 in V/C) and greater in CsA-treated virgin rats when compared to vehicle-treated rats (V/CsA; 1 ± 0.3 vs 0.21 ± 0.2 in V/C), however these differences were not statistically significant. After 20 days, V and P rats had similar (NS) GFR and RBF decreases and CsA vs Control for GFR ($p < 0.001$), for RBF ($p < 0.01$), and a similar RVR increase (NS). MBP values showed similar decreases in V vs P rats (NS) and a decrease in Csa vs C animals ($p < 0.05$). SCsA was lower in P vs V rats ($p < 0.001$). All expression in the interstice increased for V/CsA vs V/C rats

($p < 0.001$) and for G/CsA vs P/C rats ($p < 0.05$). The same was observed in the afferent arteriole, for V/CsA vs v/C ($p < 0.01$); however it was not statistically significant for pregnant rats. Only the V/CsA group had an IF score of 0.2 ± 0.1 after 20 days. In the middle of normal pregnancy, CsA altered the renal hemodynamics, impairing both the increase of GFR and the decrease of BP, although the blood levels of the drug were lower in pregnant rats than in virgin rats. The NO urinary system does not seem to be connected to this phenomenon. All expression in the interstice and in the afferent arteriole was greater for CsA treated-pregnant animals vs controls. Pregnancy did not impair CsA-induced interstitial fibrosis.

Key-Words: 1. Nephrotoxicity; 2. Cyclosporine A; 3. Pregnancy; 4. Rats.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimento Especial	ii
Agradecimentos	iii
Epígrafe	vi
Figuras	vii
Tabelas	ix
Abreviaturas e Siglas	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xvi
1. Introdução	01
1.1. Objetivos	15
2. Material e Métodos.....	16
2.1. Animais e dieta.....	17
2.2. Determinação do 1º dia de prenhez da rata.....	17
2.3. Tratamento.....	18
2.4. Ingesta da dieta e peso diário	18
2.5. Filtração glomerular renal (FGR) - depuração de inulina	19
2.6. Estudo hemodinâmico.....	21
2.6.1. Fluxo sanguíneo renal (FSR), resistência vascular renal (RVR) e pressão arterial média (PAM)	21
2.7. Concentração de ciclosporina A no sangue materno.....	22

2.8.	Volume urinário (VU), excreção urinária de sódio (UNa), fração de excreção de sódio (FeNa), osmolalidade urinária (UOsm), depuração osmolar (COsm), creatinina plasmática e urinária.....	23
2.9.	Dosagem de óxido nítrico.....	24
2.10.	Estudo histológico	24
2.11.	Estudo imunohistoquímico	25
2.12.	Análise bioquímica e estudo histológico dos rins de ratos machos	26
2.13.	Análise estatística	28
3.	Resultados.....	29
3.1.	Ganho de peso e peso fetal	30
3.2.	Filtração glomerular renal – (FGR).....	31
3.3.	Hemodinâmica renal: fluxo sanguíneo renal (FSR) e resistência vascular renal (RVR).....	31
3.4.	Pressão arterial média (PAM)	32
3.5.	Concentração de ciclosporina A no sangue materno (SCsA)	33
3.6.	Volume urinário (VU), excreção urinária de sódio (UNa), fração de excreção de sódio(FeNa), osmolalidade urinária (UOsm) e depuração osmolar (COsm).....	40
3.7.	Dosagem de óxido nítrico.....	43
3.8.	Estudo histológico	44
3.9.	Estudo imunohistoquímico	45
3.10.	Análise bioquímica e estudo histológico dos rins de ratos machos	51
4.	Discussão.....	52
5.	Conclusões.....	61

6. Referências bibliográficas	63
7. Apêndices.....	78

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A ciclosporina A (CsA) é um peptídeo cíclico com 11 aminoácidos, produzido pelo fungo *Tolypocladium inflatum gams*. É uma molécula altamente hidrofóbica, solúvel em lipídios e em outros solventes orgânicos. Essa característica permite que a CsA apresente grande volume de distribuição e alcance concentrações teciduais elevadas.⁽¹⁻³⁾

A CsA tem potente atividade imunossupressora, singular por ter efeitos seletivos sobre os linfócitos. Foi descoberta por Borel na década de 70, no decorrer da avaliação de drogas antifúngicas. Verificou-se, então, que a CsA tinha pequena atividade antifúngica, mas possuía notável efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos.^(4,5) A CsA inibe a proliferação dos clones de células T, atuando em dois locais diferentes. O principal efeito é a inibição da via de transcrição para a síntese de linfocinas, especialmente a interleucina-2 (IL-2). A droga pode também inibir a expressão de receptores para a IL-2 nas células que respondem a esta linfocina.⁽²⁾ O efeito inibitório sobre a produção de IL-2 deve-se à ação relativamente seletiva sobre a transcrição do gene desta interleucina. A interação do antígeno e o receptor das células T aumenta o cálcio intracelular pela via do trifosfato de inositol (InsP3). O cálcio liga-se à calmodulina, estimulando a calcineurina, uma fosfatase cálcio-dependente, que promove a desfosforilação do componente citosólico do NFTA (fator nuclear dos linfócitos T ativados); conseqüentemente, o NFTA entra no núcleo e forma complexos com os componentes nucleares, necessários à ativação completa das células T, incluindo a ativação dos genes para a formação da IL-2 e outras

linfocinas. A CsA liga-se a uma proteína citosólica denominada ciclofilina; esse complexo liga-se à calcineurina, inibindo a atividade enzimática da calcineurina. Ocorre, conseqüentemente, o bloqueio da desfosforilação do NFTA_c (fator nuclear citosólico dos linfócitos T ativados), o qual não entra no núcleo da célula, interferindo, assim, na ativação da célula T e na produção de IL-2 e de outras linfocinas. A ciclosporina também inibe a liberação de histamina pelos mastócitos.^(1,2)

Com a inibição da calcineurina, outros genes, além da IL-2, sofrem alterações na sua transcrição, como os de outras interleucinas, do receptor para IL-2, da sintase do óxido nítrico (NOS), do fator β transformador do crescimento (TGF- β), da endotelina, do colágeno I e II. É possível que a inibição da calcineurina, que bloqueia a resposta imune mediada por células contra o tecido transplantado, ocorra em outros genes ao mesmo tempo, podendo desencadear uma seqüência de eventos indesejáveis que resultarão na toxicidade renal. O desenvolvimento de inibidores seletivos da calcineurina sem afetar outros genes poderia esclarecer essa questão importante.⁽⁶⁾

O uso clínico da CsA revolucionou o campo dos transplantes de órgãos, reduzindo significativamente a morbidade e a incidência de rejeição, especialmente em transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea. Com o seu uso, houve uma significativa melhora da sobrevida dos enxertos a curto e médio prazo, a possibilidade de uso de doses menores de corticoesteróides e a diminuição das complicações agudas em transplante de medula. Posteriormente, observou-se que a droga era efetiva no tratamento das doenças auto-imunes, como uveíte, psoríase, asma brônquica, artrite

reumatóide, lúpus eritematoso e síndrome nefrótica de diversas etiologias.⁽⁷⁻¹²⁾

A grande utilização da CsA na prática clínica atual faz com que um número crescente de pacientes seja exposto ao fármaco.

O seu efeito tóxico mais grave e limitante é a nefrotoxicidade que, associada à hipertensão e alterações metabólicas, pode causar comprometimento renal crônico evolutivo.⁽³⁾ A nefrotoxicidade, induzida pela CsA, pode manifestar-se como uma disfunção renal aguda ou uma nefropatia crônica. A nefrotoxicidade aguda caracteriza-se por um comprometimento renal de natureza funcional e reversível, sem alterações histológicas renais significativas. Por outro lado, a nefrotoxicidade crônica manifesta-se por queda da filtração glomerular, acompanhada por fibrose intersticial irreversível do parênquima renal e por hialinose arterial, que pode evoluir para insuficiência renal crônica terminal.^(13,14)

A nefrotoxicidade aguda da CsA é causada por importante vasoconstrição renal na arteríola aferente, levando ao aumento da resistência vascular renal, à queda do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ Essa vasoconstrição ocorre preferencialmente na arteríola aferente, mas também se observa em pequenas artérias adjacentes, incluindo os capilares glomerulares.^(16,19) O mecanismo preciso dessa vasoconstrição permanece indeterminado, e existe um grande interesse dos pesquisadores em determinar qual ou quais mecanismos estão envolvidos na nefrotoxicidade aguda causada pelo uso da CsA. Existem vários possíveis mediadores da nefrotoxicidade aguda por CsA, porém o bloqueio isolado de nenhum destes mediadores foi capaz de proteger completamente a função renal. A patogênese da

vasoconstrição causada pela CsA é complexa e multifatorial, ocorrendo através da lesão endotelial e do desequilíbrio entre sistemas vasodilatadores e vasoconstritores.⁽²⁰⁾

Os mediadores que têm sido implicados nesse efeito vasoconstrictor são o aumento da atividade do sistema nervoso simpático,⁽²¹⁾ o aumento da liberação renal e sistêmica da endotelina,⁽²²⁾ o aumento da produção de tromboxano A₂, a redução de prostaglandinas vasodilatadoras,⁽²³⁻²⁶⁾ perturbações no relaxamento vascular dependente de óxido nítrico (NO),^(27,28) a ativação do sistema renina-angiotensina, o fator ativador de plaquetas, a geração de radicais livres de oxigênio, a adenosina, o efeito direto da droga na musculatura vascular, entre outros.^(29,30)

Os mecanismos causadores da nefrotoxicidade crônica são obscuros. Vários estudos experimentais visam estudar os mecanismos que levam à nefrotoxicidade crônica pela CsA. A teoria inicialmente formulada é de que a combinação da vasoconstrição com as lesões estruturais das arteríolas aferentes provocaria isquemia do néfron relacionado, levando à fibrose intersticial e à atrofia tubular.^(31,32)

O uso crônico da CsA determina alterações renais caracterizadas por atrofia tubular, dilatação tubular e fibrose intersticial irreversível com aspecto em faixas, comprometendo os raios medulares e, progressivamente, o córtex renal, geralmente acompanhado por alterações na função renal. Ocorrem alterações das túnicas média, muscular e íntima da arteríola aferente e de pequenas artérias, desde depósitos nodulares de material hialino até necrose da parede, com conseqüente diminuição do lúmen arteriolar. A nefrotoxicidade

crônica causada pelo uso da CsA foi descrita em transplantados renais ou não renais e em pacientes com doença auto-imune que receberam a droga por períodos que variam de 6 meses a mais.^(33,34) Com a interrupção da administração da CsA observa-se melhora da filtração glomerular, mas não ocorrem reversão das alterações túbulo intersticiais estruturais.⁽³⁴⁻³⁶⁾

O desenvolvimento de um modelo de nefrotoxicidade crônica por CsA em ratos, através da manobra de restrição de sal na dieta e da utilização de doses da droga próximas àquelas utilizadas em pacientes, permitiu importantes avanços na compreensão dos possíveis mecanismos da gênese dessa lesão.⁽³⁵⁾ Através deste modelo, evidenciou-se que a fibrose intersticial produzida pela CsA pode ocorrer mesmo sem alterações de fluxo plasmático renal e que macrófagos e angiotensina II (All) são fatores essenciais para a sua gênese.^(3,37,38) Através de estudos principalmente experimentais, observou-se que existe uma dissociação entre os mecanismos causadores das alterações hemodinâmicas glomerulares e os das lesões estruturais desencadeadas pelo uso da crônico da CsA^(3,37,38).

É possível que, associado ou não aos efeitos deletérios da isquemia pré-glomerular, a CsA desencadeie outros mecanismos geradores de fibrose intersticial, como a isquemia pós-glomerular, causada pela vasoconstrição da vasa recta e/ou pela estimulação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular, mediados por vários mecanismos de lesão.⁽²⁰⁾

O uso de CsA determina a ativação do sistema renina angiotensina (SRA), e conseqüentemente a liberação de All que desempenha especial papel na nefrotoxicidade crônica causada pelo uso de CsA.⁽³⁹⁾ No estudo da

nefrotoxicidade crônica causada pela CsA, utilizando-se o modelo de depleção de sal na dieta, observou-se um aumento do SRA intra-renal e sistêmico e também da AII. Esta ativa os fibroblastos e induz a deposição de matriz extracelular e conseqüentemente a fibrose intersticial.⁽⁴⁰⁾ A administração crônica de AII em ratos ocasiona uma lesão túbulo-intersticial semelhante àquela que ocorre após o uso crônico de CsA.⁽⁴¹⁾

O bloqueio do SRA pelo enalapril (inibidor da enzima conversora da angiotensina-ECA) e/ou losartan (antagonista do receptor da AII), em ratos com dieta hipossódica, que receberam cronicamente a CsA, determinou uma redução da pressão arterial, uma vasodilatação da arteríola eferente e atenuou a geração de fibrose intersticial, mas não melhorou a hemodinâmica renal. O trabalho observa que a AII é um fator determinante para a nefrotoxicidade crônica pela CsA e que os mecanismos causadores da lesão crônica podem ocorrer independentemente das alterações na hemodinâmica renal. Essa proteção estrutural pode ser decorrente da melhora do fluxo medular, regulado por receptores de AII na região da *vasa recta*, ou da inibição dos efeitos proliferativos da AII.^(30,37)

A liberação de aldosterona, desencadeada pela ativação do SRA, destaca-se como um elemento importante nos mecanismos de progressão da doença renal crônica. O bloqueio da aldosterona preveniu a lesão renal em modelos de hipertensão. A administração de aldosterona reverteu a proteção oferecida pelo losartan, em modelos de hipertensão e ablação renal utilizados no estudo de doenças renais.⁽⁴²⁾ Em um estudo experimental em ratos para avaliar a nefrotoxicidade crônica pela CsA, observou-se que a espironolactona

(antagonista da aldosterona) forneceu proteção funcional e estrutural renal em modelos de nefrotoxicidade crônica pela CsA.⁽⁴³⁾

O uso crônico de CsA estimula a produção sistêmica e renal do TGF- β . Estudos experimentais e clínicos determinam que a maior expressão do TGF- β pode ser um fator importante para o desenvolvimento de nefrotoxicidade crônica por CsA. Utilizando-se o modelo de ratos com dieta hipossódica e tratados com CsA, notou-se aumento progressivo no TGF- β renal, que precedeu o desenvolvimento posterior de fibrose túbulo intersticial.⁽³⁾ O uso de anticorpos anti-TGF- β reduziu a expressão de TGF- β renal, impediu a queda da FGR, e diminuiu a hialinose arteriolar, mas não melhorou a fibrose túbulo-intersticial. Cubaci et al observaram que 72% das biópsias renais de pacientes transplantados, tratados com CsA e com fibrose túbulo intersticial, expressavam altos níveis do TGF- β .⁽⁴⁴⁾ A ativação do SRA parece estar relacionado à alta produção do TGF- β , induzida pelo uso da CsA.⁽⁴²⁾

Portanto, o TGF- β não é o responsável isolado por todos os efeitos da CsA, nos mecanismos de deposição de matriz extracelular e cicatrização renal.⁽⁴⁵⁾

Vários autores observaram, em modelo de depleção de sal para estudo da nefrotoxicidade crônica pela CsA, uma significativa infiltração precoce de macrófagos, precedendo uma diminuição da FGR e, também, o desenvolvimento de fibrose intersticial. Esta infiltração estava acompanhada de proliferação de células tubulares e intersticiais que começava na medula e caminha para áreas corticais de fibrose.^(3,38) O infiltrado de macrófagos é um fator que desempenha importante papel no desenvolvimento de fibrose renal

progressiva.⁽⁴⁶⁾ O estímulo que causa a ativação e a infiltração precoce de macrófagos é uma questão importante. Pode ser a isquemia pós-glomerular, causada pela constrição dos *vasa recta*, a lesão nas células epiteliais tubulares e células endoteliais, que permite o extravasamento do plasma na área intersticial renal ou a ativação das células intersticiais renais residentes.⁽⁴²⁾ A AII recruta e também ativa os macrófagos; de fato, células humanas ativam o SRA durante a diferenciação macrófago/monócito em humanos.⁽⁴⁷⁾ A inibição da infiltração de macrófagos através da colchicina, melhorou a fibrose intersticial renal no modelo de ratos com dieta hipossódica e tratados com CsA.⁽⁴⁸⁾

A adição do substrato L-arginina, que aumenta a produção do óxido nítrico (NO), melhora a deposição dos componentes da matriz extracelular, mas o uso do inibidor da sintase do óxido nítrico (NOS), o L-NAME, agrava a fibrose túbulo-intersticial induzida pelo uso da CsA.⁽⁴⁹⁾

O uso da CsA aumenta a produção de endotelina, e esta aumenta a expressão do TGF- β , que está claramente envolvido no desenvolvimento de fibrose intersticial renal, induzida pelo uso de CsA.⁽⁴²⁾

Atualmente a hipótese para explicar a nefrotoxicidade crônica causada pela CsA pode ser analisada, verificando-se vários aspectos. Pode ser causada seja pela isquemia pré-glomerular, seja pelos efeitos diretos da CsA no interstício ou ainda efeitos diretos independentes da vasoconstrição da arteríola aferente, que depende da ativação do sistema renina angiotensina, e conseqüente liberação da AII. Além da ação vasoconstrictora pré-glomerular, pode ocorrer também ação vasoconstrictora pós-glomerular, regulada por

receptores da All na região dos *vasa recta*. A fibrose intersticial renal é dependente do aumento do SRA e de All e pode ocorrer independentemente das alterações na hemodinâmica renal. Os mecanismos de nefrotoxicidade crônica por CsA, dissociados da isquemia pré-glomerular, parecem ser dependentes também do infiltrado de macrófagos e fibroblastos e da ativação das células intersticiais.

Os efeitos indiretos e diretos da migração dos macrófagos, da constricção dos *vasa recta*, da ativação das células residentes intersticiais, da lesão da célula endotelial, do extravasamento de plasma na área intersticial e dos estímulos inflamatórios originados da lesão das células tubulares, podem ser parte desse fenômeno complexo. Está claro que mais de um fator pode estar envolvido. Estabelece-se um ambiente intersticial inflamatório no qual a All, a aldosterona, os macrófagos, os fibroblastos, as células residentes e etc., interagem com substâncias pró-fibróticas como as citocinas, os fatores de crescimento, os oxigênios reativos, etc., e aumentam a deposição de matriz extracelular e, conseqüentemente ocasionam a fibrose intersticial.⁽⁴²⁾

O aperfeiçoamento da imunossupressão, de técnicas cirúrgicas e do acompanhamento dos pacientes permitiu um expressivo aumento do número de pacientes submetidos a transplantes nas últimas décadas.⁽⁵⁰⁾ Esse fato, somado ao amplo leque de doenças atualmente tratadas com CsA, elevou o número de mulheres em idade fértil tratadas por este imunossupressor e, conseqüentemente, aumentaram as chances de gestação sob o efeito de CsA.⁽⁵¹⁾

A gravidez provoca várias mudanças funcionais e anatômicas nos rins, como aumento do tamanho, alterações na hemodinâmica renal e variações nos níveis plasmáticos de hormônios que afetam a função renal. Assim, há aumento na produção da renina, do angiotensinogênio, da angiotensina, da aldosterona, das prostaglandinas vasodilatadoras, da desoxicorticosterona, da progesterona, do lactogênio placentário e da gonadotrofina coriônica.⁽⁵²⁾ Há aumento do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular; uma diminuição da creatinina sérica e o aumento do débito cardíaco, associados à diminuição da resistência periférica e à retenção de sódio, potássio e cálcio.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾

O aumento do fluxo sanguíneo renal (FSR) se dá nas primeiras semanas de gestação, de 40 a 60% por volta da 15ª semana, persistindo até a 36ª semana, e retorna aos níveis normais no final da gravidez; o ritmo de filtração glomerular renal (FGR) aumenta aproximadamente de 60 a 70% acima dos valores normais, ou seja, antes da gravidez.⁽⁵⁵⁾

A gravidez geralmente não piora as doenças renais, podendo mesmo haver melhora temporária da função renal durante esse período. Existem inúmeros relatos de gravidez que transcorre com sucesso em pacientes que fazem diálise ou em pacientes transplantados.⁽⁵³⁾ Considera-se que a melhora da função esteja relacionada à diminuição da resistência vascular periférica.^(52,53)

Durante a gravidez, a microcirculação renal apresenta mecanismos adaptativos, como uma vasodilatação intra-renal, redução proporcional das resistências das arteríolas aferente e eferente, manutenção da pressão

hidrostática intraglomerular e conseqüente aumento do fluxo plasmático glomerular.⁽⁵⁵⁾

Entre as várias mudanças e adaptações maternas que ocorrem durante a gravidez, é importante destacar a vasodilatação de órgãos não envolvidos com a reprodução, como o rim.⁽⁵⁶⁾ A substância responsável por esta ação vasodilatadora renal vem sendo investigada por vários pesquisadores.

O estradiol é considerado um vasodilatador sistêmico uterino na gravidez, mas com pouco efeito na circulação renal. A progesterona tem capacidade vasodilatadora limitada na circulação renal.⁽⁵⁶⁾

Durante a gravidez normal, a excreção urinária de várias prostaglandinas ou de seus metabólitos é elevada. Em estudos experimentais, observou-se que a inibição das prostaglandinas não reverte a hiperfiltração renal da gravidez. Outro trabalho experimental sobre a participação do estrógeno e da progesterona na vasodilatação arterial mostrou um aumento significativo na expressão de prostaglandinas vasodilatadoras na artéria renal, em animais ovariectomizados e com tratamento com estradiol quando comparados ao grupo que recebeu estradiol + progesterona.⁽⁵⁷⁾

Outro possível mediador da vasodilatação renal na gravidez é o *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP), um neuropeptídeo vasodilatador que regula a resistência vascular e tem papel na adaptação vascular durante a gravidez normal, diminuindo a resistência total, inclusive na artéria renal. O CGRP parece estar envolvido na adaptação renal vascular que ocorre durante a gravidez. É possível que os hormônios estradiol e progesterona modulem positivamente os efeitos hemodinâmicos regionais e sistêmicos do CGRP.⁽⁵⁸⁾

O óxido nítrico (NO) é uma substância com possível envolvimento na vasodilatação renal e conseqüente hiperfiltração na gravidez. A excreção urinária do NO e seus metabólitos é elevada durante a gravidez. Trabalhos experimentais verificaram que a inibição crônica do NO não é capaz de inibir a vasodilatação sistêmica e renal da gravidez. Dados experimentais revelaram que a inibição do NO, juntamente com o bloqueio das prostaglandinas, reverte tanto a vasodilatação como a hiperfiltração glomerular na gravidez.⁽⁵⁵⁾

A relaxina é um hormônio produzido pelo corpo lúteo em humanos e roedores. Em humanos, possui funções fisiológicas importantes, tais como amolecer os ligamentos colagenosos da bacia pélvica durante a gestação, facilitar a dilatação cervical, contribuir para o desenvolvimento da glândula mamária e participar do processo de ruptura da parede folicular durante a ovulação.⁽⁵⁹⁾ Sherwood observou que em animais, tem importante papel na gravidez de ratos, camundongos e porcos, atuando como substância vasodilatadora; promove o desenvolvimento da cérvix, das glândulas mamárias, preparando para a lactação; inibe a contratilidade uterina; reduz a fibrose no rim, coração, pulmão e fígado.⁽⁶⁰⁾ Vários trabalhos têm demonstrado ser a relaxina o principal mediador que permite a vasodilatação e hiperfiltração renal que ocorre na gravidez.^(56,61-64)

Durante a gravidez ocorre aumento da reabsorção tubular de sal e água, devido ao aumento da filtração glomerular, evitando depleção de volume extracelular. Da mesma forma, ocorre aumento na excreção de ácido úrico, cálcio e magnésio e redução na excreção de potássio, glicose e uréia.⁽⁵⁵⁾

As características farmacocinéticas da CsA permitem que a droga e seus metabólitos se acumulem no sangue materno, na placenta e cordão umbilical, passando para o feto em desenvolvimento.^(65,66) De fato, observaram-se níveis significantes da droga na placenta e no leite materno de pacientes após transplante renal.⁽⁶⁷⁾ Em estudos utilizando ratas prenhes, a CsA provoca atraso temporário no desenvolvimento dos órgãos hematopoiéticos⁽⁶⁸⁾ e fetotoxicidade, se usada em doses elevadas como de 25 mg/Kg/dia.⁽⁶⁹⁾ Clinicamente não é teratogênica, mas pode provocar retardo de crescimento intra-uterino.⁽⁷⁰⁾ A maioria dos autores considera que o uso correto e com acompanhamento médico cuidadoso de CsA durante a gravidez é viável.^(66,71)

Surpreendentemente, existem poucos estudos analisando os efeitos da interação entre gravidez e a CSA. Os trabalhos disponíveis usaram parâmetros de avaliação da função renal pouco sensíveis, como medidas semanais de creatinina.^(66,71) As alterações hormonais e hemodinâmicas provocadas no organismo materno pela gravidez podem ter significativa influência na nefrotoxicidade da CsA, bem como a CsA pode mudar o padrão de alterações hemodinâmicas que ocorrem na gravidez normal.

1.1. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Avaliar o efeito da interação entre CsA e gravidez na função e estrutura renal;
2. Avaliar o efeito da gravidez sobre os níveis sanguíneos de CsA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e dieta

Foram utilizadas ratas Munich-Wistar com um peso inicial variando de 220g a 250g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Autarquia Estadual, sob responsabilidade do médico veterinário Dr. João Vicente de Paiva Netto. O projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da FAMERP (parecer em 25/09/2001 pelo Prof. Dr. Jerri do Carmo Caldeira).

Os animais receberam dieta pobre em sal (0,06%) e normoproteica (25%) (Teklad, Wisconsin, USA), durante todo o período de tratamento e/ou gestacional.

2.2. Determinação do 1º dia de prenhez da rata

Com a finalidade de determinar com precisão o primeiro dia de prenhez das ratas, estas foram acasaladas com os ratos machos durante a noite e, pela manhã, foram realizados esfregaços vaginais, para verificar a presença de espermatozóides. Se confirmada ao microscópio de luz, o dia foi considerado como o primeiro dia de prenhez.

2.3. Tratamento

As ratas foram divididas em quatro grupos (10 ratas/grupo): ratas virgens tratadas com CsA (V/CsA), ratas prenhes tratadas com CsA (G/CsA), ratas virgens tratadas com veículo (V/C) e ratas prenhes tratadas com veículo (G/C).

A CsA foi dissolvida em álcool absoluto (12,5%), diluído em óleo de oliva (87,5%), e injetada por via subcutânea na dose de 15 mg/Kg de peso corpóreo/dia nos grupos tratados, virgens e prenhes. Da mesma forma, o veículo (óleo de oliva + álcool absoluto) foi injetado de forma isovolumétrica nos animais do grupo controle, virgens e prenhes.

Os 4 grupos de estudo foram avaliados em dois períodos, no 10^o e 20^o dia de prenhez, o que equivale à metade e ao final do período gestacional da rata. A duração da gestação da rata é de 21 dias.

2.4. Ingesta da dieta e peso diário

O peso dos animais e a quantidade de dieta ingerida foram verificados diariamente. O cuidado diário com a quantidade de ração hipossódica para as ratas se deveu à garantia de que as ratas que receberam veículo não ingerissem mais ração do que as ratas que receberam a CsA. Ou seja, para que este fator não interferisse nos resultados. No início do estudo, verificou-se a média diária de ração, consumida pelas ratas que estavam recebendo CsA, tanto virgens como prenhes, e utilizamos a mesma quantidade para as ratas que receberiam somente o veículo.

2.5. Filtração glomerular renal (FGR) - depuração de inulina

O procedimento iniciou-se com um grupo de animais, 24 horas após a última dose de CsA ou veículo. As ratas foram submetidas à anestesia com injeção intraperitoneal de uma solução de 50 mg/ml/Kg de tiopental sódico (0,1ml por 100g de rato).

Após a anestesia, foi realizada traqueostomia utilizando-se cateter de polietileno PE-240 (Becton Dickinsons, Nova Jersey, EUA). Seguiu-se a cateterização (PE 50) da veia jugular direita, para infusão de soluções (inulina e soro fisiológico); a cateterização da artéria carótida esquerda, para medida da pressão arterial média (PAM), e a coleta de amostras de sangue para as dosagens sanguíneas da concentração de inulina plasmática. Na seqüência, procedeu-se à incisão mediana para localização da bexiga; efetuando-se uma pequena incisão para canulação com cateter PE-160. A urina passou então a ser coletada em tubos, para posterior aferição do volume urinário e das concentrações urinárias de inulina. A uretra foi ligada para evitar perdas de urina. Finalizado o processo cirúrgico, iniciou-se o procedimento da depuração de inulina.

Os animais receberam 1ml da solução de inulina (Sigma , EUA)) na concentração de 25 mg/ml (0,3 g em 12 ml de NaCl a 0,9 %); em seguida receberam lentamente solução fisiológica (5 ml), seguida de solução de inulina na concentração de 25 mg/ml, de forma contínua através de bomba de infusão (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA), na velocidade de 0,06 ml/min. Neste momento, iniciou-se a contagem de um período de 50 minutos, necessário para

o equilíbrio hemodinâmico do animal após a cirurgia. Durante o equilíbrio, a temperatura e pressão arterial do animal foram continuamente monitoradas.

Após 50 minutos de estabilização, a urina foi coletada em tubos previamente pesados e devidamente identificados, por 3 períodos consecutivos de 20 minutos cada, os quais foram utilizados para o cálculo do volume urinário ($\mu\text{l}/\text{min}$)

Na metade de cada período da coleta de urina, foi coletado 0,3 ml de sangue com heparina, e o sangue retirado foi repostado imediatamente com o mesmo volume de NaCl a 0,9% .

O plasma e urina serviram para a dosagem da concentração de inulina pelo método da antrona, com o auxílio do espectrofotômetro (Espectrofotômetro BTS 310 – Biosystems, Barcelona, Espanha). Verificou-se a PAM durante todo o procedimento, pela cateterização da artéria carótida acoplada a um transdutor de pressão (Stoelting Co., Illinois, EUA), e verificada através de um amplificador (Blood pressure display unit, Stoelting Co., Illinois, EUA). O volume urinário ($\mu\text{l}/\text{min}$) foi determinado pela diferença de peso dos tubos de coleta de urina (peso ao final do período de coleta – peso inicial do tubo). Os dados da depuração da inulina foram calculados em $\text{ml}/\text{min}/100\text{g}$, representando a média dos três períodos de coleta. Os resultados para a PAM representam a média de todos os registros obtidos em todo o experimento.

Os dados obtidos foram submetidos à fórmula para o cálculo da depuração de inulina para verificação da taxa de filtração glomerular renal.

$$\text{Depuração de inulina} = (U \text{ (mg/dL)} \times V \text{ (ml/min)}) / P \text{ (mg/dL)} = (\text{ml/min}/100\text{g})$$

U (mg/dL) = concentração urinária de inulina

V (ml/min) = volume urinário

P (mg/dL) = concentração plasmática de inulina

2.6. Estudo hemodinâmico

2.6.1. Fluxo sanguíneo renal (FSR), resistência vascular renal (RVR) e pressão arterial média (PAM)

O estudo foi realizado 24 horas após a última injeção de CsA ou veículo. Os ratos selecionados para esta análise foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/ml); na proporção de 0,1ml a cada 100g de rato.

Após a anestesia, realizou-se traqueostomia com cateter de polietileno PE-240 (Becton Dickinsons, Nova Jersey, EUA). Em seguida, realizou-se a cateterização (PE 50) da artéria carótida esquerda para medida da pressão arterial média (PAM), e da veia jugular direita para a expansão volêmica (cateter PE-50). Realizou-se laparotomia mediana, o isolamento do rim esquerdo e do pedículo renal e a dissecação da artéria renal para instalação de uma *probe* vascular (série R, 1.5 mm, Transonic System, Ithaca, NY, EUA), apropriada para medida direta do fluxo arterial renal em ratos.

Administrou-se então 6 ml de solução fisiológica 0,9%, seguidos por infusão contínua desta solução na velocidade de 0,06 ml/min em bomba de infusão (Harvard, EUA). Após o período de 60 minutos de estabilização,

realizou-se as medidas do FSR através de fluxômetro por *doppler* (T 106, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, EUA) e com o auxílio de um gel condutor (HR Lubricating Jelly, Transonic, Nova York, EUA). O fluxômetro para pesquisa animal utiliza a técnica de ultra-som *Transit-time*, medindo direta e quantitativamente o fluxo de sangue. Foram realizadas quatro medidas contínuas em períodos de 10 minutos, obtendo-se a média dos quatro registros, para cada experimento. A PAM foi avaliada concomitantemente através de um transdutor de pressão (Stoelting Co., Illinois, EUA), ligado à artéria carótida e a um amplificador de pressão (Blood pressure display unit, Stoelting Co., Illinois, EUA). A resistência vascular renal (RVR) foi calculada pela fórmula:

$$\text{RVR} = \text{PAM} / \text{FSR} \text{ (mmHg/ml/min)}.$$

2.7. Dosagem de ciclosporina A no sangue materno

Ao final dos experimentos de depuração de inulina, foi coletado o total de 3 ml de sangue do grupo que recebeu CsA dos dois períodos estudados (10 e 20 dias), em tubo contendo 0,1ml de EDTA 10%, que foi armazenado a -20°C, para determinação posterior dos níveis sanguíneos da CsA. A dosagem do nível sanguíneo da droga foi realizada através de radioimunoensaio de fluorescência polarizada, empregando-se anticorpo monoclonal específico (Laboratório Fleury, São Paulo, SP).

2.8. Volume urinário (VU), Creatinina plasmática e urinária, Excreção urinária de sódio (UNa), Fração de excreção de sódio (FeNa), Osmolalidade urinária (UOsm) e Depuração osmolar (COsm)

Os animais foram colocados em gaiola metabólica (Nalgene, Nalge Company, Rochester NY, EUA) ao final do período de tratamento. Após 24 horas na gaiola metabólica, verificou-se o volume da diurese coletada, e a urina foi centrifugada e utilizada para as dosagens bioquímicas.

O animal foi então anestesiado com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50mg/ml); na proporção de 0,1ml a cada 100g de rato. Em seguida, realizou-se a cateterização arterial (PE 50), coletou-se o sangue, para as dosagens bioquímicas.

A urina e o plasma foram usados para as seguintes dosagens: sódio através do analisador de eletrólitos (Mod. 9180, Electrolyte Analyser, AVL Scientific Co., Roswell GA, EUA), creatinina pelo método de picrato alcalino (Jaffé), e analisada por espectrofotômetro (BTS 310 ByoSystems, Barcelona, Espanha), a osmolalidade em osmômetro através do ponto de congelamento (Osmette A, Precision Systems, Natick, MA, EUA). As fórmulas utilizadas para cálculo da fração de excreção de sódio e depuração osmolar foram:

Fração de excreção de sódio (%):

$$\text{FeNa} = (\text{UNa} / \text{PNa} \times 100) / (\text{UCr} / \text{PCr})$$

UNa e PNa = concentração urinária e plasmática de sódio (mmol/L)

UCr e PCr = concentração urinária e plasmática de creatinina (mg/dL)

Depuração osmolar (ml/min) :

$$CO_{sm} = (U_{osm} \times V) / P_{osm}$$

U_{osm} = osmolalidade urinária (mOsm/kg)

V = volume urinário (ml)

P_{osm} = osmolalidade plasmática

2.9. Dosagem de óxido nítrico

Após 10 dias de tratamento, a urina foi coletada durante 24 horas em gaiola metabólica. A análise da concentração urinária do óxido nítrico foi realizada pela redução do NO_3 em NO_2 com a enzima nitrato redutase pelo método de Bartholomeu. O NO_2 gerado do NO_3 pela enzima nitrato redutase e o NO_2 presente na urina foram detectados e quantificados pela reação de Griess ($\mu\text{mol/mgCr}$).

2.10. Estudo histológico

Ao término dos experimentos de FGR, realizou-se a nefrectomia do rim esquerdo. O rim foi seccionado longitudinalmente, fixado em formaldeído a 4% em soro fisiológico, e posteriormente colocado em álcool 70%. O material foi incluído em parafina, e obtidas secções finas (3-4 μm), que foram montadas, numeradas e coradas por hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico e reativo de Schiff (PAS), tricrômio de Masson e ácido periódico prata metanamina (PAMS); a graduação morfométrica para fibrose intersticial, atrofia tubular,

hialinose e esclerose glomerular global foi efetuada por um único patologista, que não conhecia a que grupo pertenciam as amostras.

2.11. Estudo imunohistoquímico

Na análise da reação para angiotensina II procedeu-se à contagem do número de células positivas (40 campos), por área de 0,245mm² no interstício do córtex renal e nas arteríolas aferentes.

O anticorpo utilizado foi o policlonal IgG purificado de coelho anti-angiotensina II específico (Península Laboratories, San Carlos, USA.). Com o animal anestesiado com Tiopental sódico (50mg/ml), o fluxo sanguíneo foi interrompido com um fio cirúrgico no pedículo renal direito e o rim direito removido. Após a retirada da cápsula, efetuaram-se três cortes transversais de 3 mm de largura, e o material foi colocado em metacarn (60% metanol,30% clorofórmio e 10% ácido acético).

Após o processo de fixação, procedeu-se à desidratação e diafanização, para inclusão em parafina e posterior preparo dos cortes em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silane 4%, Sigma). A parafina foi eliminada com xilol e álcool.

Para a reação de angiotensina II (Península Laboratories, San Carlos, USA), as lâminas foram colocadas em água destilada, azida sódica e água oxigenada para o bloqueio da peroxidase endógena, e lavamos em PBS com Tween. Em seguida realizou-se a adsorção com soro de cabra (PBS, saponina e soro de cabra), que foi colocado em cima do corte por 30 minutos em câmara

úmida a temperatura ambiente. Uma vez retirado o soro de cabra e colocou-se o anticorpo primário para angiotensina II na diluição 1/200, cobrindo todo o material, que foi deixado durante a noite (4°C) em câmara úmida. Procedeu-se à lavagem do material por duas vezes em PBS com Tween.

Em seguida, o anticorpo secundário biotinado foi colocado na diluição 1/400, o qual foi incubado por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente, sendo em seguida lavado por duas vezes em PBS com Tween. Cobriu-se, então, o material com o complexo avidina-biotina e incubou-se o mesmo por 30 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente, lavando-se em seguida em PBS com Tween por duas vezes. Seguiu-se então a coloração da reação com o corante DAB (DAB, 10mg/ml, tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 e cloreto de níquel a 8%). Para tanto, incubou-se o material por 10 minutos a 37°C; e em seguida a lavou-se o mesmo em água destilada, realizando-se a contra coloração com corante metilgreen por 1 minuto, cobriu-se todo o material por duas vezes com etanol 95% , duas vezes com etanol 100%, xilol IV, xilol V e xilol VI. O material foi montado o material com lamínula para a contagem de células por campo no interstício e também em arteríolas aferentes no córtex renal, utilizando-se microscópio de luz (aumento de 400 x).

2.12. Análise Bioquímica e estudo histológico dos rins de ratos machos

Foram utilizados ratos machos Munich-Wistar com um peso inicial em torno de 220 a 250g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade

de Medicina – FAMERP. Os animais receberam a CsA por via subcutânea na dose de 15 mg/Kg, dissolvida em álcool absoluto (12,5%), diluído em óleo de oliva (87,5%). Receberam dieta pobre em sal (0,06%) e normoproteica (25%) (Marca Teklad, Wisconsin, USA), durante o período de 21 dias.

Os animais foram colocados em gaiola metabólica (Nalgene, Nalge Company, Rochester NY, EUA) ao final do período de tratamento; após 24 horas, a urina foi utilizada para verificação do volume e para as dosagens bioquímicas.

Em seguida, o animal foi anestesiado com injeção intraperitoneal de Tiopental sódico (50 mg/ml); sendo 0,1ml a cada 100g de rato para coleta de sangue para as dosagens bioquímicas.

A urina e o plasma foram utilizados para as dosagens de creatinina pelo método de picrato alcalino (Jaffé), a qual foi analisada por espectrofotômetro (BTS 310 ByoSystems, Barcelona, Espanha). O nível sanguíneo da CsA foi realizado através de radioimunoensaio de fluorescência polarizada, empregando anticorpo monoclonal específico (Laboratório Fleury, São Paulo, SP). No estudo histológico foram utilizados as colorações de hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico e reativo de Schiff (PAS), Tricrômio de Masson e ácido periódico prata metanamina (PAMS). A graduação morfológica para fibrose intersticial, atrofia tubular, hialinose e esclerose glomerular global foi realizada por um único patologista, que não conhecia a que grupo pertenciam as amostras.

2.13. Análise estatística

A análise estatística entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls quando se encontrou diferença significativa ($p < 0,05$).

A análise entre dois grupos foi realizada pelo teste t de Student para amostras independentes, considerando-se significância ao nível de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Ganho de peso e peso final

A média dos pesos para os animais que receberam 10 dias de tratamento, foi de $218 \pm 4,0$ g (V/CsA); $221 \pm 3,0$ g (G/CsA); $208 \pm 3,0$ g (V/C) e $213 \pm 6,0$ g (G/C), não se verificando diferença estatisticamente significativa entre os tratadas com CsA ou com veículo. Entretanto, após 20 dias de tratamento, as ratas prenhes apresentaram peso maior, tanto em relação às virgens tratadas com CsA; (V/CsA $188 \pm 4,0$ g vs G/CsA $210 \pm 5,0$ g, $p < 0,01$); quanto às virgens tratadas com veículo; (V/C $198 \pm 4,0$ vs G/C $236 \pm 6,0$, $p < 0,001$). As ratas prenhes que receberam veículo apresentaram peso maior quando comparado às ratas prenhes que receberam CsA ($p < 0,001$).

A análise do ganho de peso diário para os animais dos grupos que receberam 10 dias de tratamento mostrou que as ratas prenhes ganharam mais peso em relação às virgens, tanto as ratas tratadas com CsA; (G/CsA $18,3 \pm 2,0$ g vs V/CsA $6,7 \pm 2,0$ g, $p < 0,01$), quanto para o grupo controle; (V/C $0,23 \pm 2,0$ g vs G/C $20,1 \pm 5,0$ g, $p < 0,001$).

Para os animais após 20 dias de tratamento, o valor do ganho de peso foi de $34,3 \pm 3,0$ g (G/CsA); de $11,2 \pm 1,4$ g (V/CsA); de $47,6 \pm 3,5$ g (G/C) e de $6,2 \pm 1,3$ g (V/C). As ratas prenhes apresentaram ganho de peso maior do que as virgens ($p < 0,001$).

Os animais G/C, quando comparados aos animais G/CsA, nos dois períodos de estudo, apresentaram maior ganho de peso, mas com diferença significativa para os animais estudados após 20 dias ($p < 0,001$).

3.2. Filtração glomerular renal (FGR)

Após 10 dias de tratamento, a FGR das ratas prenhes foi maior do que a das virgens. No entanto, tal diferença foi significante somente para os animais que receberam veículo. Assim, o grupo V/CsA apresentou FGR de $0,79 \pm 0,07$ ml/min/100g, e o grupo G/CsA, $0,95 \pm 0,07$ ml/min/100g (NS). O grupo V/C apresentou FGR de $0,94 \pm 0,05$ ml/min/100g e o grupo G/C, $1,19 \pm 0,04$ ml/min/100g ($p < 0,05$). As ratas dos grupos G/CsA apresentaram FGR significativamente menor ($p < 0,01$) que as do grupo G/C. Após 20 dias, tanto o grupo V/CsA ($0,51 \pm 0,07$ ml/min/100g) como o grupo G/CsA ($0,55 \pm 0,09$ ml/min/100g) apresentaram queda significante na FG ($p < 0,001$), quando comparados aos grupos V/C ($0,98 \pm 0,04$ ml/min/100g) e G/C ($0,95 \pm 0,03$ ml/min/100g). Os dados estão representados nas Figuras 1, 2 e também na Tabela 1.

3.3. Hemodinâmica renal: fluxo sanguíneo renal (FSR) e resistência vascular renal (RVR)

Após 10 dias de tratamento, o FSR das ratas prenhes foi significativamente maior que o das ratas virgens, tanto no grupo controle (G/C

4,9 ± 0,2 ml/min vs V/C 3,6 ± 0,1 ml/min, p<0,001) quanto no grupo CsA (G/CsA 3,3 ± 0,2 ml/min vs V/CsA 2,4 ± 0,1 ml/min, p<0,01). O FSR das ratas controle foi significativamente maior (p<0,001) que o das ratas que receberam CsA, tanto nos animais virgens quanto nos prenhes (Tabela 1 e Figura 3).

Houve queda significativa (p<0,05) da RVR nas ratas prenhes em relação às virgens com o mesmo tratamento: V/CsA 50 ± 3 mmHg/ml/min vs G/CsA 38 ± 3 mmHg/ml/min e V/C 34 ± 2,0 mmHg/ml/min vs G/C 24 ± 1,0 mmHg/ml/min. A RVR das ratas que receberam veículo foi significativamente menor que a dos animais do grupo CsA, tanto para os animais virgens (p<0,001) como para as prenhes (p<0,01) (Tabela 1 e Figura 5).

Após 20 dias de tratamento, o FSR das ratas que receberam somente veículo foi significativamente elevado quando comparado ao FSR daquelas que receberam CsA, tanto para as virgens quanto para as prenhes (V/C 4,0 ± 0,3 ml/min vs V/CsA 2,8 ± 0,2 ml/min e G/C 4,5 ± 0,16 ml/min vs G/CsA 3,4 ± 0,19 ml/min, p<0,01) (Tabela 1 e Figura 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a RVR dos quatro grupos: 49 ± 6 mmHg/ml/min para V/CsA, 34 ± 3,0 mmHg/ml/min para G/CsA, 36 ± 3,0 mmHg/ml/min para V/C e 26 ± 1,0 mmHg/ml/min para G/C, (Tabela 1 e Figura 6).

3.4. Pressão arterial média (PAM)

A PAM após 10 dias de tratamento foi de 129 ± 5,0 mmHg no grupo V/C vs 112 ± 4,0 mmHg no grupo G/C, sendo significativamente menor nas ratas prenhes em relação às virgens (p<0,05). No grupo G/CsA, a PAM foi de 110 ±

3,0 mmHg vs $118 \pm 4,0$ mmHg no grupo V/CsA (NS), como pode ser observado na Figura 7 e na Tabela 1. Após 20 dias de tratamento, os valores encontrados para o grupo V/C foram de $131 \pm 3,0$ mmHg, $125 \pm 4,0$ mmHg para o grupo G/C, $115 \pm 4,0$ mmHg para o grupo V/CsA, $108 \pm 4,0$ mmHg para o grupo G/CsA. Os grupos de virgens e prenhes tratadas com CsA, apresentaram PA significativamente menor quando comparados aos controles ($p < 0,05$) (Figura 8 e Tabela 1).

3.5. Concentração de ciclosporina no sangue materno (SCsA)

Os valores de CsA no sangue materno podem ser vistos nas Figuras 9 e 10. Nas ratas prenhes nos dois períodos de estudo, após 10 e 20 dias de tratamento, os níveis de CsA foram respectivamente de 544 ± 58 ng/ml e 1070 ± 142 ng/ml. Estes valores foram significativamente menores ($p < 0,01$) que os encontrados nas virgens nos dois períodos de estudo (805 ± 71 ng/ml e 1916 ± 201 ng/ml) (Tabela 1).

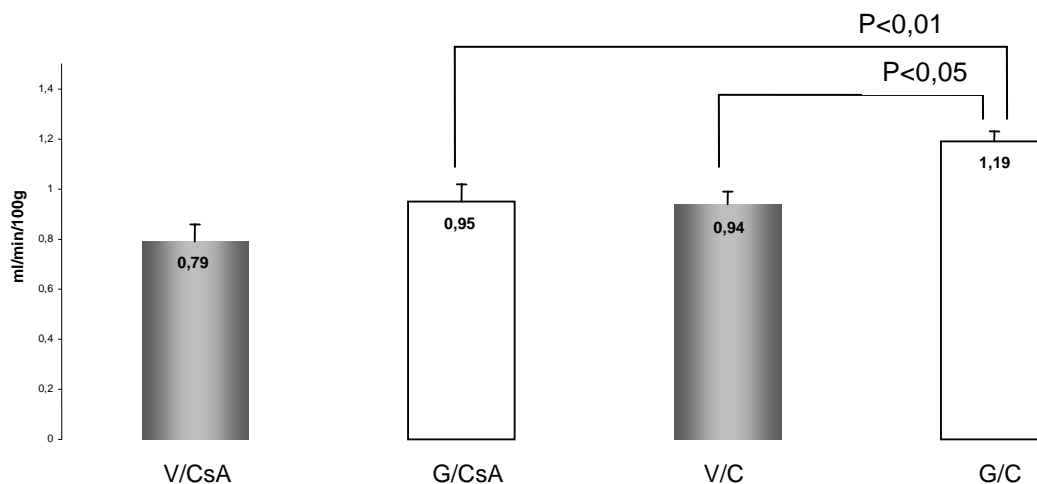


Figura 1. Filtração glomerular renal (FGR), depuração de inulina após 10 dias de tratamento.

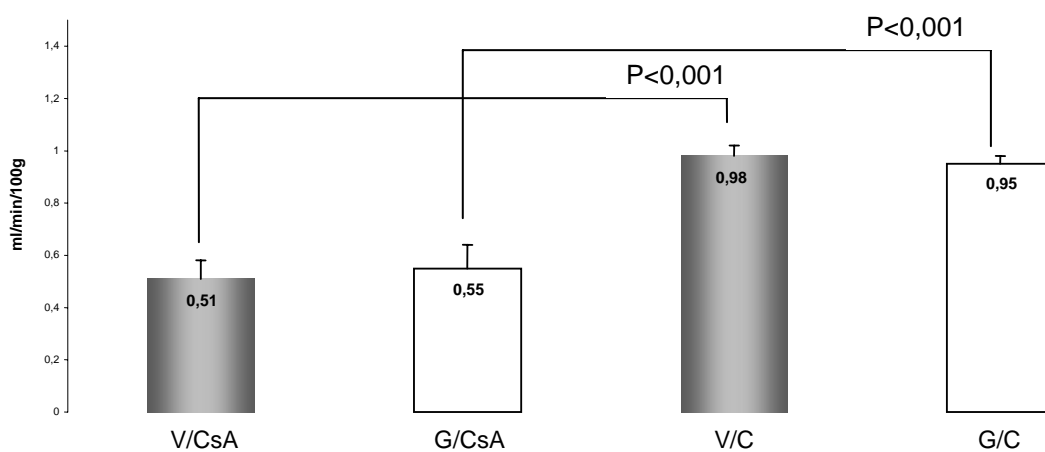


Figura 2. Filtração glomerular renal (FGR), depuração de inulina após 20 dias de tratamento.

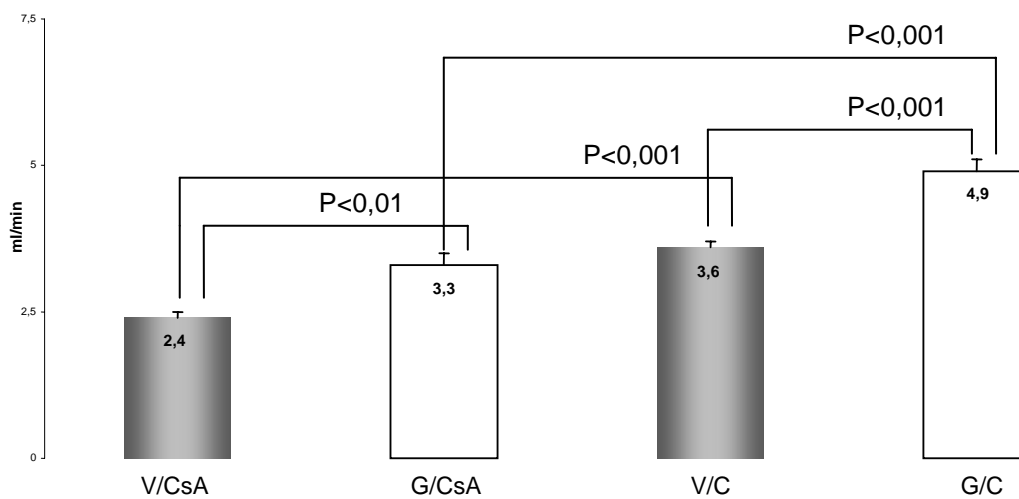


Figura 3. Fluxo sanguíneo renal (FSR) após 10 dias de tratamento.

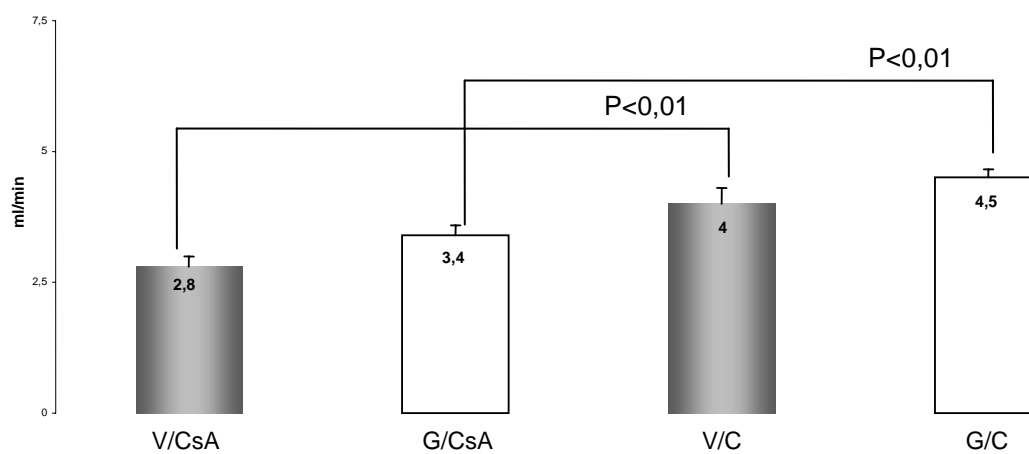


Figura 4. Fluxo sanguíneo renal (FSR) após 20 dias de tratamento.

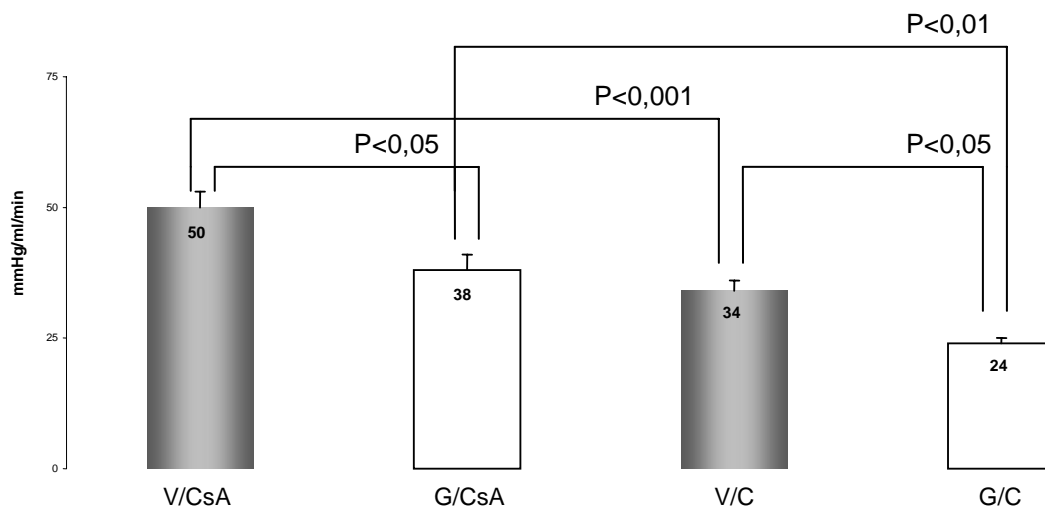


Figura 5. Resistência vascular renal (RVR) após 10 dias de tratamento.

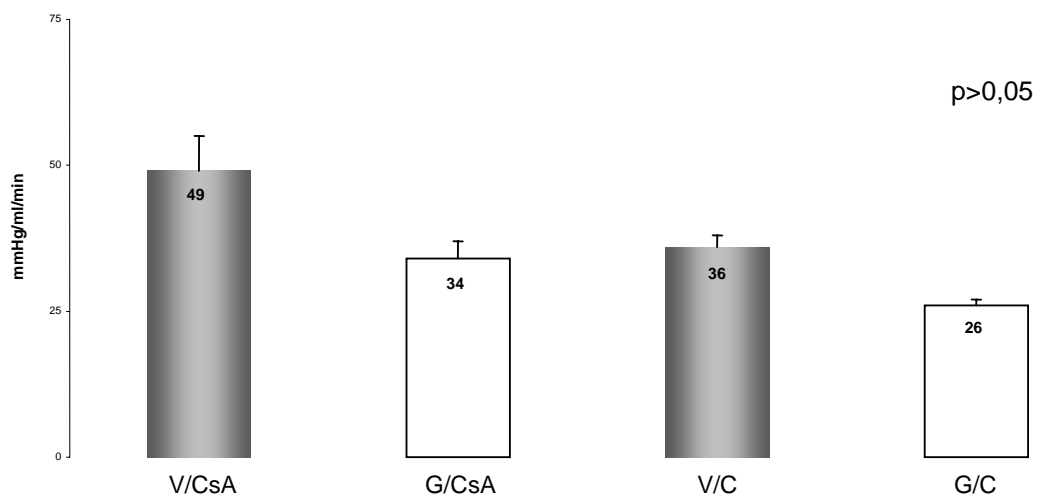


Figura 6. Resistência vascular renal (RVR) após 20 dias de tratamento.

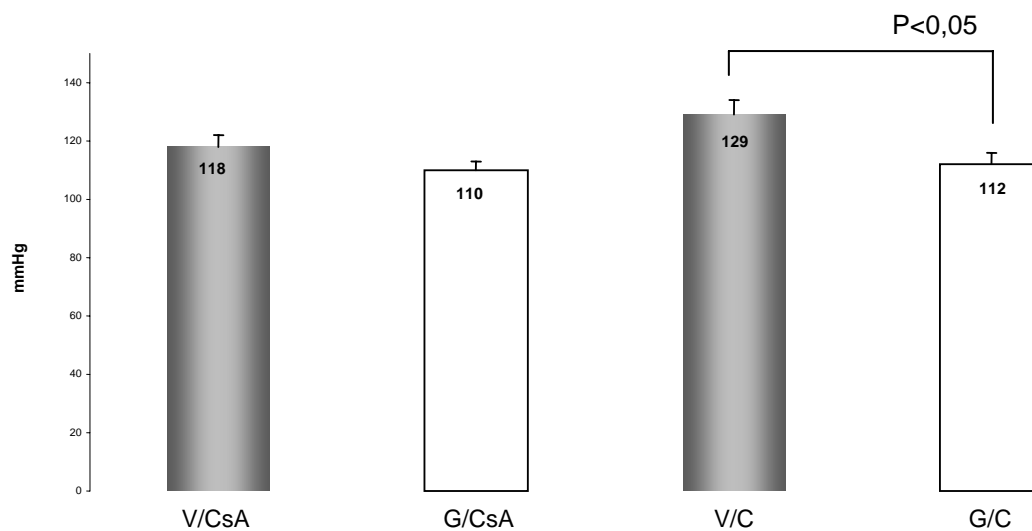


Figura 7. Pressão arterial média (PAM) após 10 dias de tratamento.

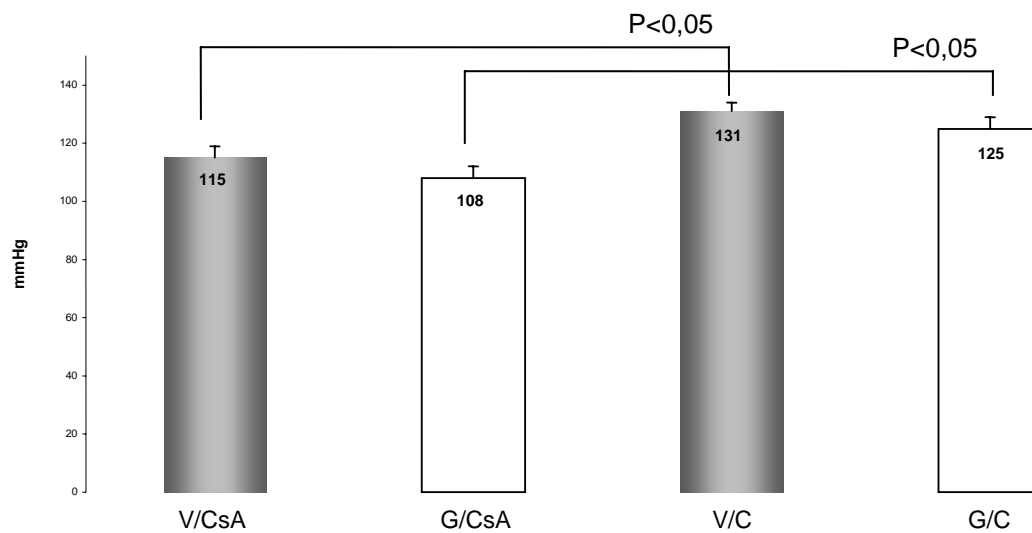


Figura 8. Pressão arterial média (PAM) após 20 dias de tratamento.

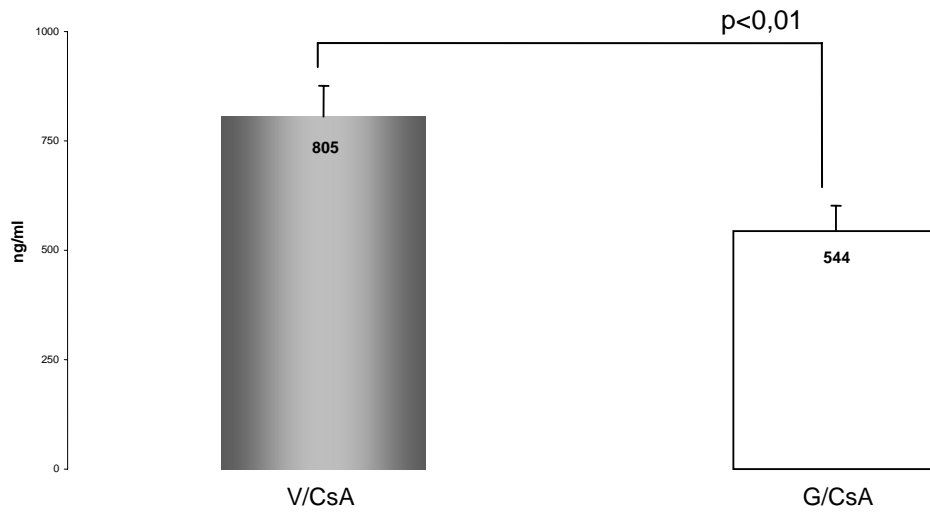


Figura 9. Concentrações de ciclosporina A no sangue materno (SCsA) após 10 dias de tratamento.

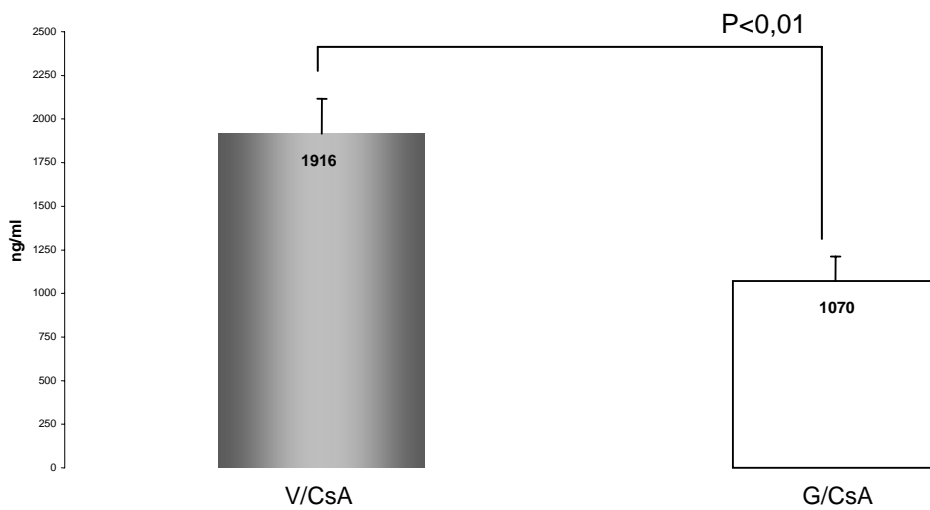


Figura 10. Concentrações de ciclosporina A no sangue materno (SCsA) após 20 dias de tratamento.

Tabela 1. Comparação entre grupos dos dados de filtração glomerular renal (FGR), fluxo sanguíneo renal (FSR), pressão arterial média (PAM), resistência vascular renal (RVR) e concentração sanguínea de ciclosporina A (SCsA).

PARÂMETROS	10 dias de Tratamento ou Gravidez				20 dias de tratamento ou gravidez			
	V/CsA	G/CsA	V/C	G/C	V/CsA	G/CsA	V/C	G/C
FGR (ml/min/100g)	0,79±0,07	0,95±0,07 ^a	0,94±0,05 ^b	1,19±0,04	0,51±0,07 ^d	0,55±0,09 ^c	0,98±0,04	0,95±0,03
(n)	(12)	(13)	(13)	(10)	(16)	(13)	(12)	(10)
FSR(ml/min)	2,4±0,1 ^{f,d}	3,3±0,2 ^c	3,6±0,1 ^c	4,9±0,2	2,8±0,2 ^g	3,4±0,19 ^a	4±0,3	4,5±0,16
(n)	(17)	(10)	(13)	(14)	(13)	(10)	(12)	(13)
PAM(mmHg)	118±4	110±3	129±5 ^b	112±4	115±4 ^e	108±4 ^b	131±3	125±4
(n)	(12)	(13)	(13)	(10)	(16)	(13)	(12)	(10)
RVRmmHg/ml/min	50±3 ^{h,d}	38±3 ^a	34±2 ^b	24±1	49±6	34±3	36±3,2	26±1
(n)	(15)	(10)	(12)	(13)	(13)	(10)	(11)	(13)
ScsA(ng/ml)	805±71 ^f	544±58			1916±201 ^f	1070±142		
(n)	(12)	(13)			(10)	(10)		

Os dados apresentam médias ± erro padrão da média (SEM). Abreviações: V/CsA-*virgens* tratadas com Ciclosporina A; G/CsA-*preñes* tratadas com Ciclosporina A; V/C-*virgens* tratadas com veículo; G/C-*preñes* tratadas com veículo; FGR-Filtração glomerular renal; FSR-Fluxo sanguíneo renal; PAM-Pressão arterial média; RVR-Resistência vascular renal e SCsA-Concentração sanguínea de Ciclosporina A. (a)p<0,01 vs G/C; (b)p<0,05 vs G/C; (c)p<0,001 vs G/C; (d)p<0,001 vs V/C; (e)p<0,05 vs V/C; (f)p<0,01 vs G/CsA; (g)p<0,01 vs V/C; (h)p<0,05 vs G/CsA.

3.6. Volume urinário (VU), excreção urinária de sódio (UNa), fração de excreção de sódio (FeNa), osmolalidade urinária (UOsm) e depuração osmolar (COsm).

O VU foi semelhante nos quatro grupos (Tabela 2).

Após 10 dias de tratamento, as ratas prenhes do grupo controle apresentaram maior excreção de sódio urinário (UNa) que os outros grupos ($12,4 \pm 3$ mmol/l para V/CsA, $12,5 \pm 1,6$ mmol/l para G/CsA, $19,4 \pm 4,6$ mmol/l para V/C e de $77,5 \pm 9,3$ mmol/l para G/C, $p < 0,001$). Após 20 dias de tratamento, a excreção urinária de sódio das ratas prenhes recebendo veículo ou CsA, foi significativamente maior que a das ratas virgens (V/CsA $49,8 \pm 9,1$ mmol/l, G/CsA $94,5 \pm 5,2$ mmol/l, V/C $47,2 \pm 1$ mmol/l e G/C $90,3 \pm 9,7$ mmol/l, $p < 0,001$) (Tabela 2).

A FeNa no 10º dia de tratamento foi significativamente maior nas ratas prenhes do grupo controle, quando comparada à dos outros três grupos (Tabela 2). Após 20 dias de tratamento, a FeNa foi maior para as ratas virgens ($0,12 \pm 0,02$ %) vs prenhes ($0,05 \pm 0,06$ %) que receberam CsA ($p < 0,001$) e maior para as ratas prenhes ($0,35 \pm 0,04$ %) vs virgens ($0,21 \pm 0,01$ %) que receberam veículo ($p < 0,05$). A fração de excreção de sódio foi também maior para as ratas prenhes do grupo controle em relação às prenhes que receberam CsA ($p < 0,05$), e para as ratas virgens do grupo controle em relação às que receberam CsA (NS) (Tabela 2).

A osmolalidade urinária (UOsm) foi semelhante entre os grupos e períodos estudados, não apresentando diferenças estatisticamente significantes (Tabela 2).

A depuração osmolar (COsm), após 10 dias de tratamento, apresentou valores médios semelhantes, sem diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Após 20 dias, a depuração osmolar das ratas virgens foi menor que a das prenhes para os animais que receberam CsA ($p < 0,05$), e foi semelhante entre os animais que receberam veículo (NS). A depuração osmolar foi maior para as ratas virgens que receberam veículo em relação às que receberam CsA ($p < 0,05$); a mesma comparação entre os animais que desenvolveram prenhez, não foi significativa. A análise estatística destacou diferenças significantes para os animais V/CsA vs G/C ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre grupos dos dados de sódio urinário (UNa), fração de excreção de sódio (FeNa), osmolalidade urinária (UOsm), depuração osmolar e volume urinário (VU).

PARÂMETROS	10 dias de Tratamento ou Gravidez				20 dias de tratamento ou gravidez			
	V/CsA	G/CsA	V/C	G/C	V/CsA	G/CsA	V/C	G/C
UNa (mmol/L)	12,4±3 ^a	12,5±1,6 ^a	19,4±4,6 ^a	77,5±9,3	49,8±9,1 ^{a,b}	94,5±5,2	47,2±1 ^{a,b}	90,3±9,7
(n)	(9)	(7)	(9)	(9)	(8)	(8)	(9)	(9)
FeNa(%)	0,05±0,01 ^a	0,06±0,006 ^a	0,07±0,01 ^a	0,28±0,02	0,12±0,02 ^{a,b}	0,5±0,06	0,21±0,01 ^{b,c}	0,35±0,04 ^d
(n)	(9)	(7)	(9)	(6)	(8)	(8)	(9)	(8)
Uosm(mOsm/Kg)	1152±148	972±102	1306±142	1132±129	1126±166	1322±133	1408±103	1352±138
(n)	(9)	(9)	(8)	(9)	(8)	(8)	(9)	(8)
Cosm(ml/min)	0,018±0,001	0,018±0,002	0,016±0,002	0,019±0,002	0,013±0,002 ^{c,d,e}	0,025±0,002	0,022±0,002	0,021±0,002
(n)	(9)	(9)	(8)	(9)	(8)	(8)	(9)	(8)
VU (µl/min)	5±0,45	5,36±0,6	3,8±0,5	4,92±0,3	4±0,6	5,6±0,65	4,7±0,37	4,4±0,3
(n)	(9)	(9)	(9)	(9)	(8)	(8)	(9)	(8)

Os dados apresentam médias ± erro padrão da média (SEM). Abreviações: V/CsA-virgens tratadas com Ciclosporina A; G/CsA-grávidas tratadas com Ciclosporina A; V/C-virgens tratadas com veículo; G/C-grávidas tratadas com veículo; UNa-Sódio urinário; FeNa-Fração de excreção de sódio; UOsm-Osmolalidade urinária e COsm-Depuração osmolar. (a)p<0,001 vs G/C; (b)p<0,001 vs G/CsA; (c)p<0,05 vs G/C; (d)p<0,05 vs G/CsA; (e)p<0,05 vs V/C.

3.7. Dosagem de óxido nítrico

Após 10 dias de tratamento, os valores do óxido nítrico urinário foram de $4,98 \pm 1 \mu\text{mol/mgCr}$ para V/CsA; $4,74 \pm 1 \mu\text{mol/mgCr}$ para G/CsA; $3,82 \pm 0,75 \mu\text{mol/mgCr}$ para V/C e $4,16 \pm 0,96 \mu\text{mol/mgCr}$ para G/C. Estas diferenciações não foram estatisticamente significantes.

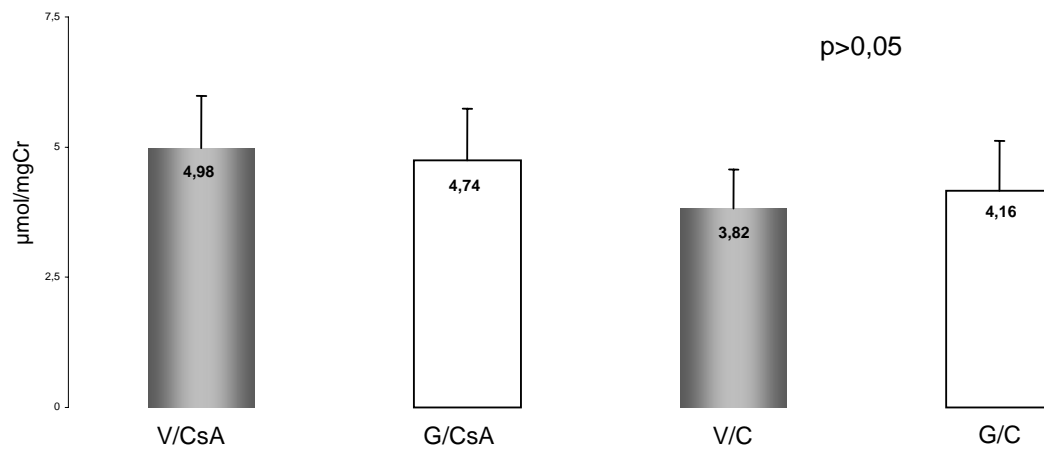


Figura 11. Análise do óxido nítrico urinário de ratas após 10 dias de tratamento.

3.8. Estudo histológico

Após 10 dias de tratamento com veículo ou CsA, os rins das ratas virgens e prenhes não apresentaram fibrose Intersticial (FI). Após 20 dias de tratamento registrou-se $0,2 \pm 0,1$ de escore para FI somente nas virgens tratadas com CsA. Os outros grupos não apresentaram FI.

Ratos machos tratados de forma similar às fêmeas apresentaram índice de fibrose intersticial de $0,66 \pm 0,21$.

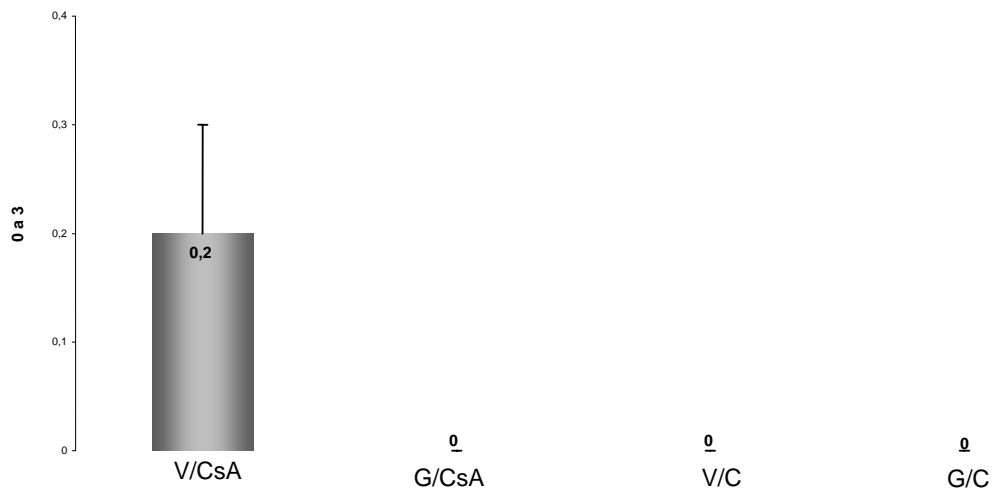


Figura 12. Histograma de frequência da fibrose intersticial (FTI) após 20 dias de tratamento.

3.9. Estudo imunohistoquímico

A expressão para angiotensina II no interstício do córtex renal na metade da gravidez não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, embora tenha ocorrido tendência a valores maiores nas ratas grávidas comparadas às virgens, (V/CsA $2,5 \pm 0,4$; G/CsA $3,9 \pm 0,6$; V/C $1,9 \pm 0,86$ e G/C $4 \pm 1,4$). Ao final do período gestacional da rata, o interstício do córtex renal das prenhes do grupo controle apresentou maior expressão de células positivas para All em relação às virgens (G/C $2,5 \pm 0,2$ vs V/C $0,62 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Após 20 dias de tratamento, a expressão da All foi maior no interstício do córtex renal das ratas virgens que receberam CsA, em relação às virgens do grupo controle (V/CsA $4,9 \pm 0,9$; vs V/C $0,62 \pm 0,1$, $p < 0,001$). A expressão de All foi maior no interstício do córtex renal das ratas prenhes com CsA, em relação ao interstício do córtex renal das ratas prenhes do grupo controle; G/CsA $4,2 \pm 0,4$ vs G/C $2,5 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) (Figuras 13 e 14).

A expressão de angiotensina II nas arteríolas aferentes na metade da gravidez foi significativamente maior no grupo G/CsA $2,2 \pm 0,6$, quando comparado ao grupo V/C $0,21 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), os valores para os outros grupos foram de V/CsA $1 \pm 0,3$ e G/C $1,3 \pm 0,3$. Após 20 dias de tratamento, as ratas que receberam CsA, virgens ou prenhes, apresentaram maior excreção de All na arteríola aferente em relação às virgens controle V/CsA $3 \pm 0,7$ vs V/C $0,23 \pm 0,1$ ($p < 0,01$); G/CsA $2,4 \pm 0,7$ vs V/C $0,23 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) e para o grupo G/C o valor foi de $1,8 \pm 0,3$ (Figuras 15 e 16).

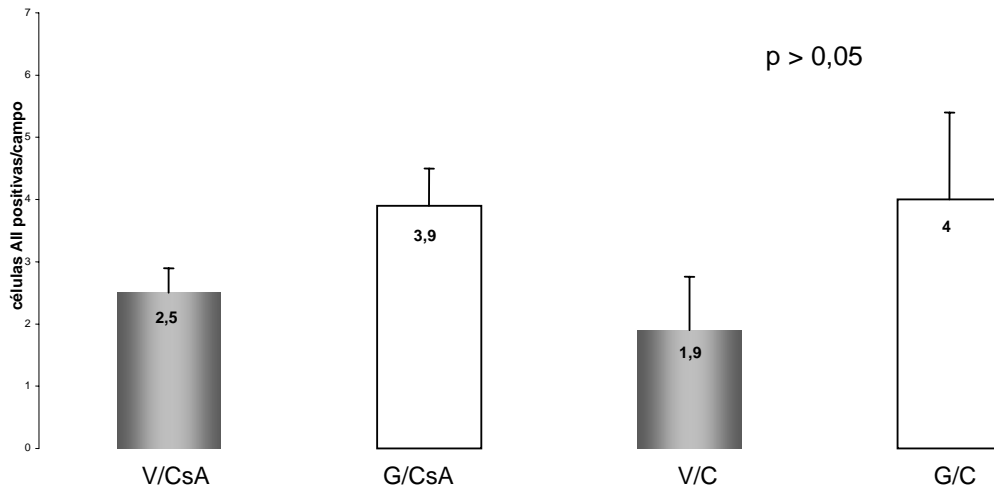


Figura 13. Células All positivas por área de $0,245 \mu\text{m}^2$ do interstício do córtex renal após 10 dias de tratamento.

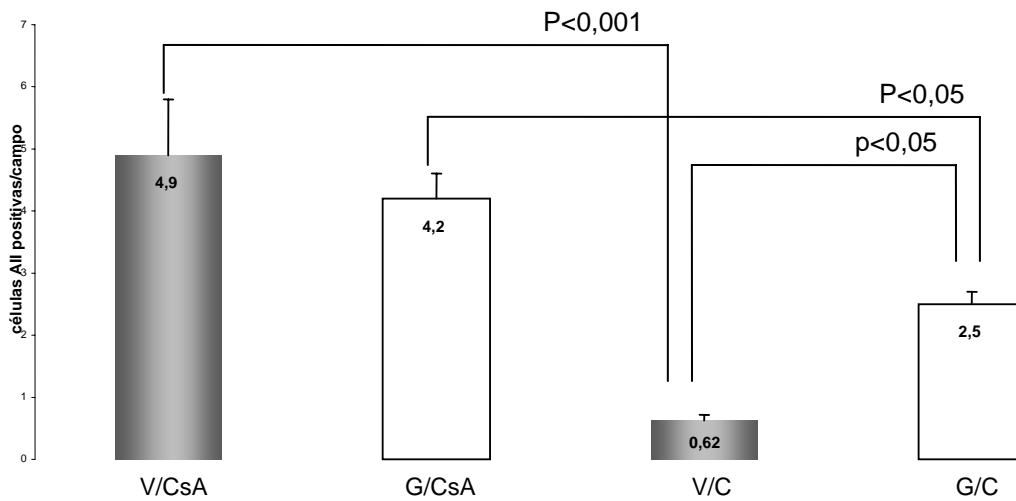


Figura 14. Células All positivas por área de $0,245 \mu\text{m}^2$ do interstício do córtex renal após 20 dias de tratamento.

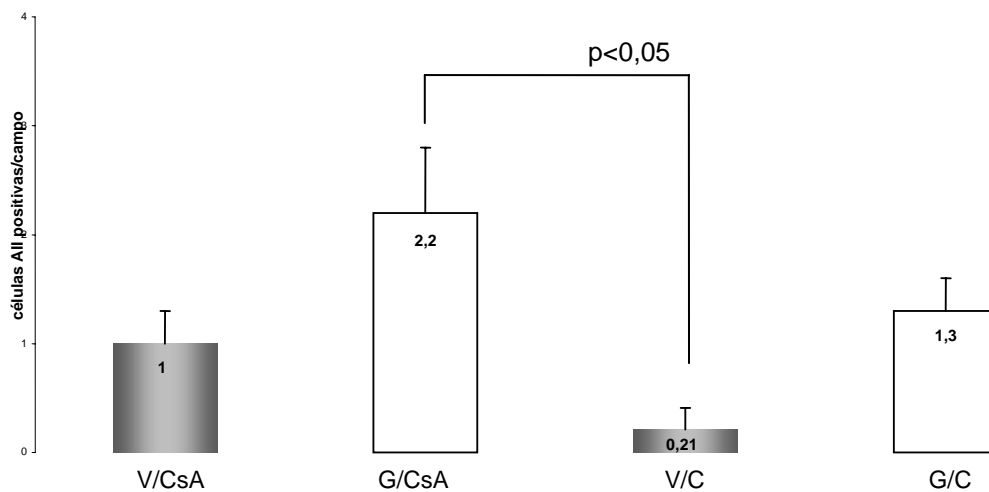


Figura 15. Células All positivas por área de $0,245 \mu\text{m}^2$ em arteríolas aferentes do córtex renal após 10 dias de tratamento.

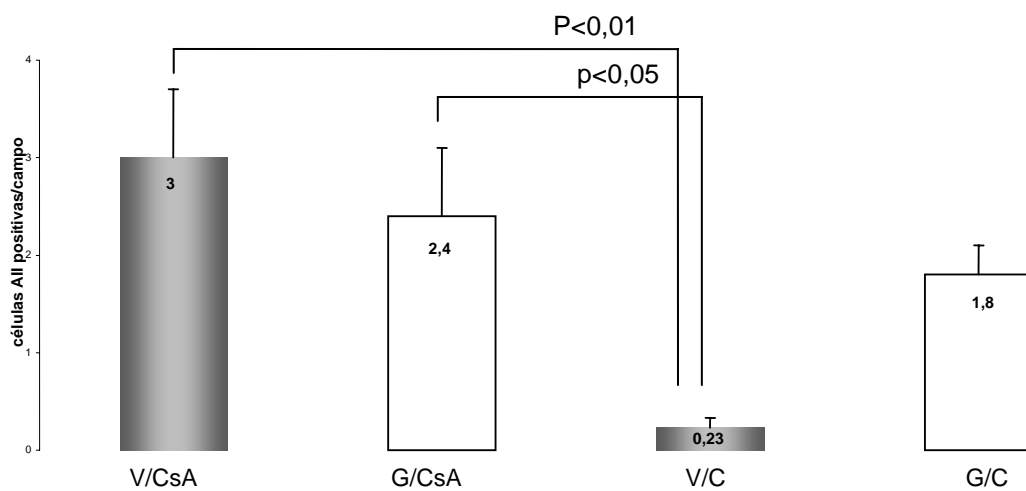


Figura 16. Células All positivas por área de $0,245 \mu\text{m}^2$ em arteríolas aferentes do córtex renal após 20 dias de tratamento.

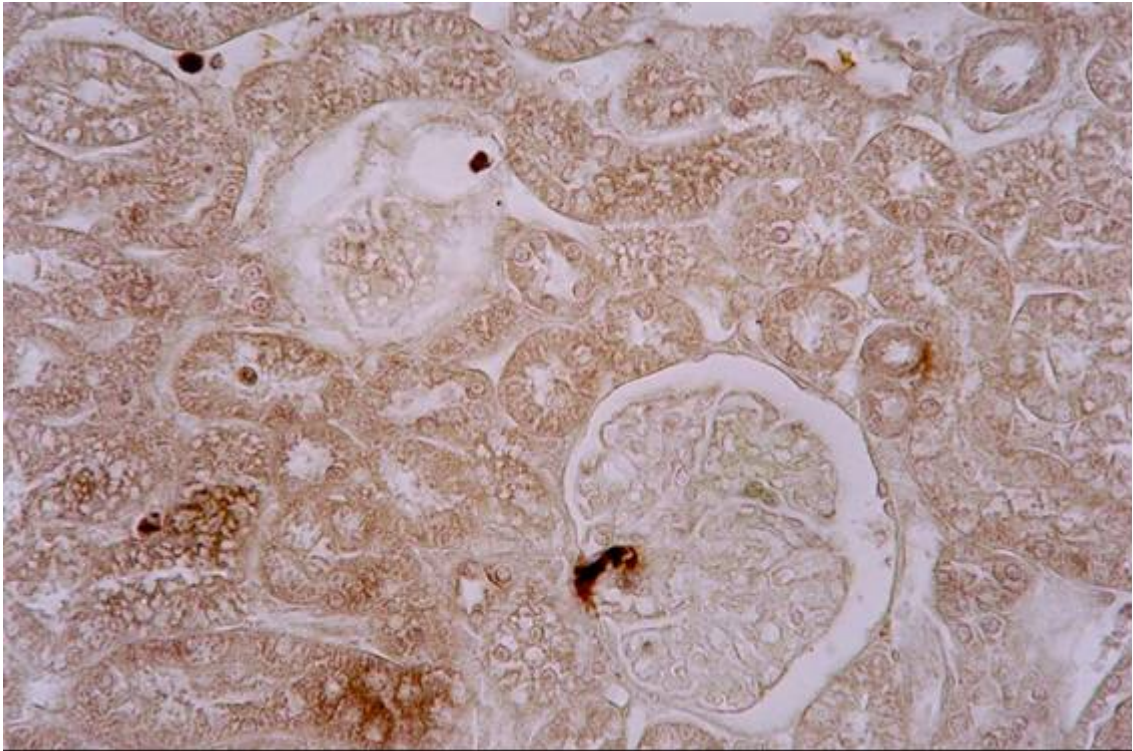


Figura 17. Imuno-localização de All no interstício do córtex renal de ratas virgens tratadas com CsA por 20 dias.

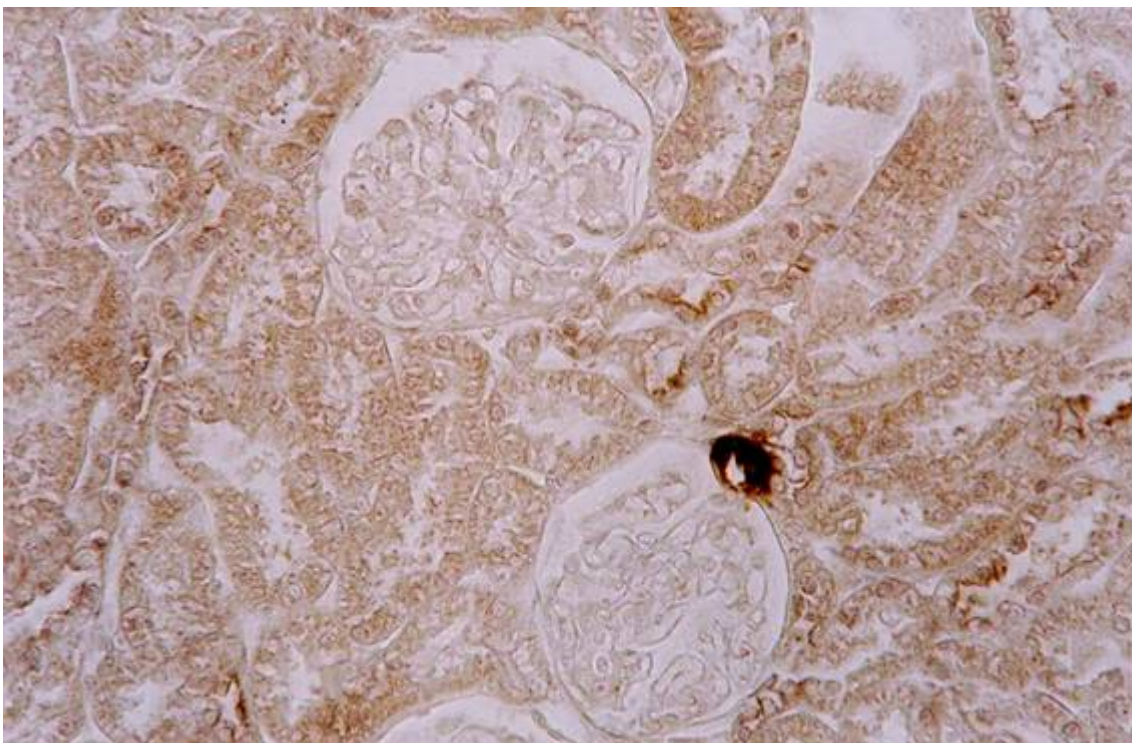


Figura 18. Imuno-localização de All no interstício do córtex renal de ratas virgens que receberam veículo por 20 dias.

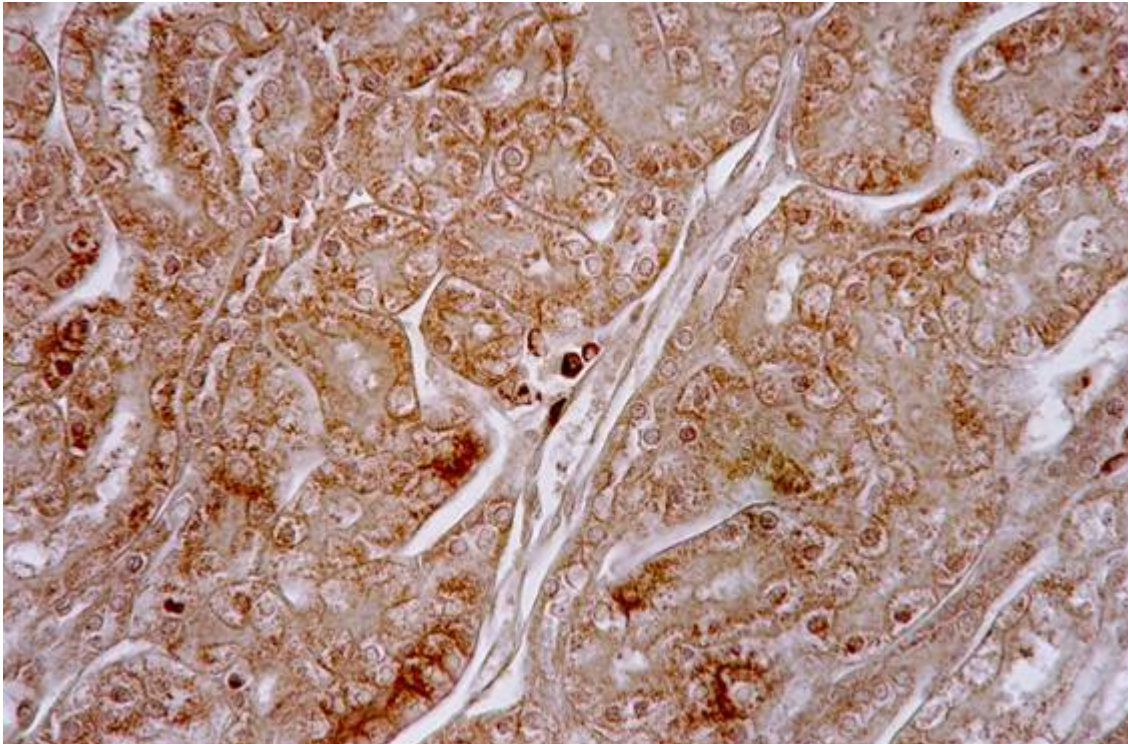


Figura 19. Imuno localização da A II no interstício do córtex renal de ratas prenhes tratadas com CsA por 20 dias.

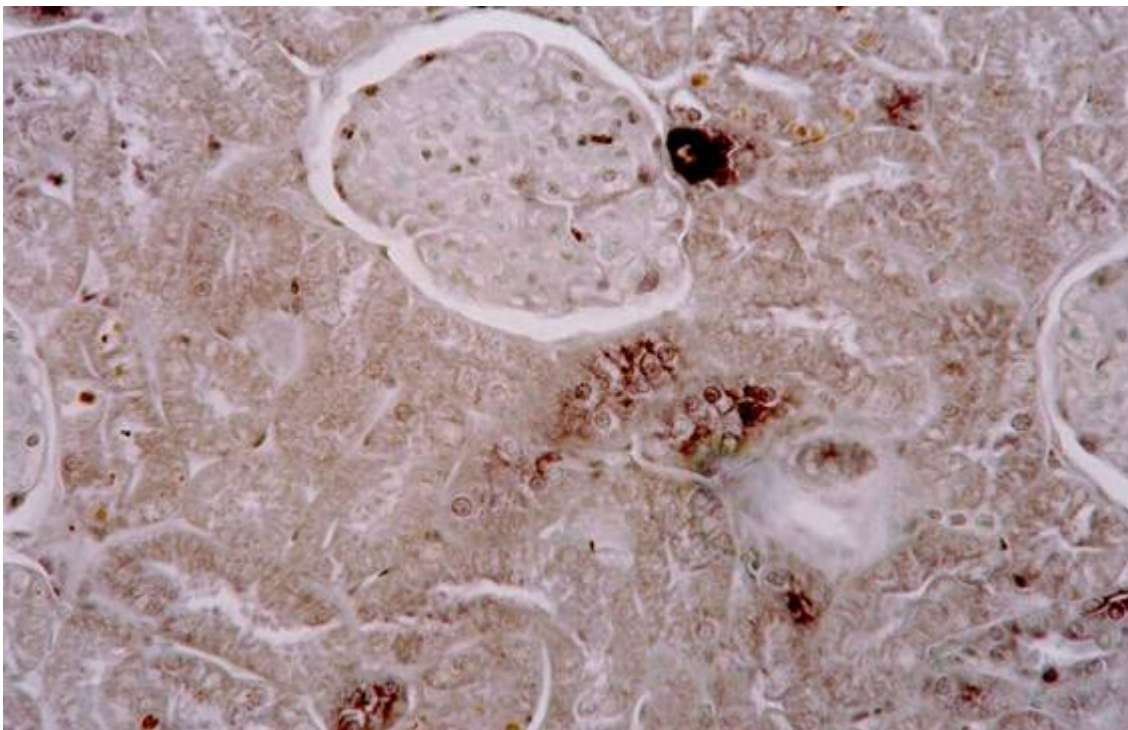


Figura 20. Imuno localização da A II no interstício do córtex renal de ratas prenhes que receberam veículo por 20 dias.

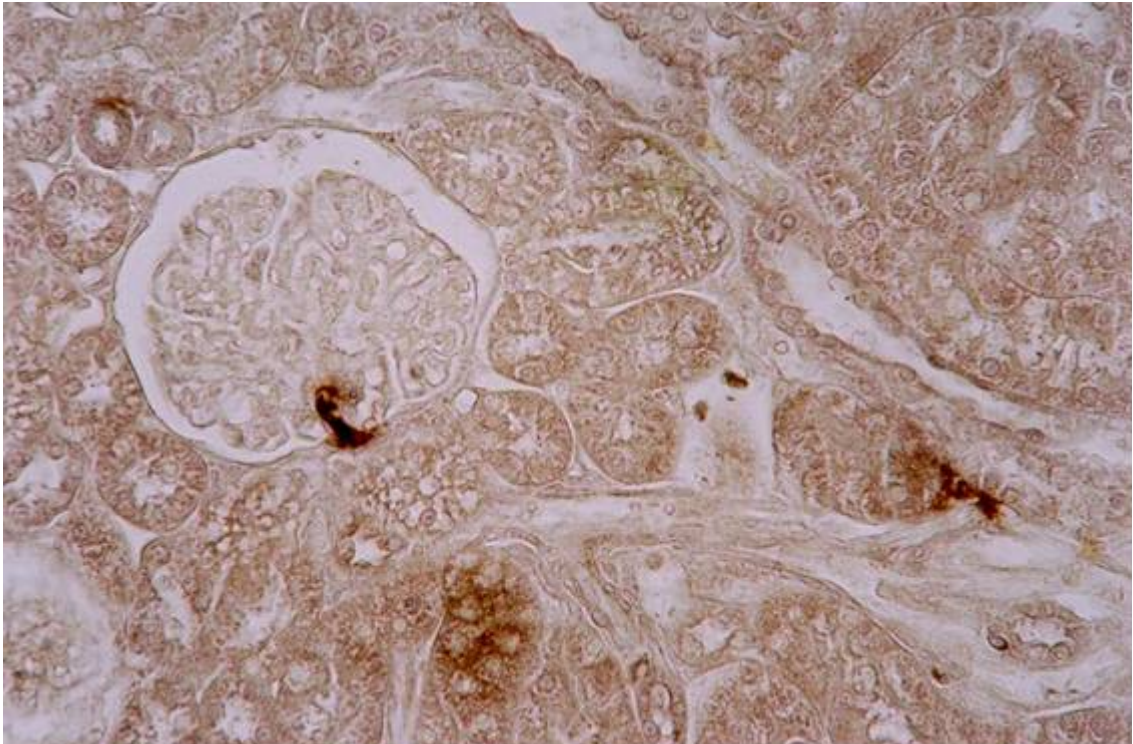


Figura 21. Imuno-localização da All na arteríola aferente no córtex renal de ratas virgens tratadas com CsA por 20 dias.

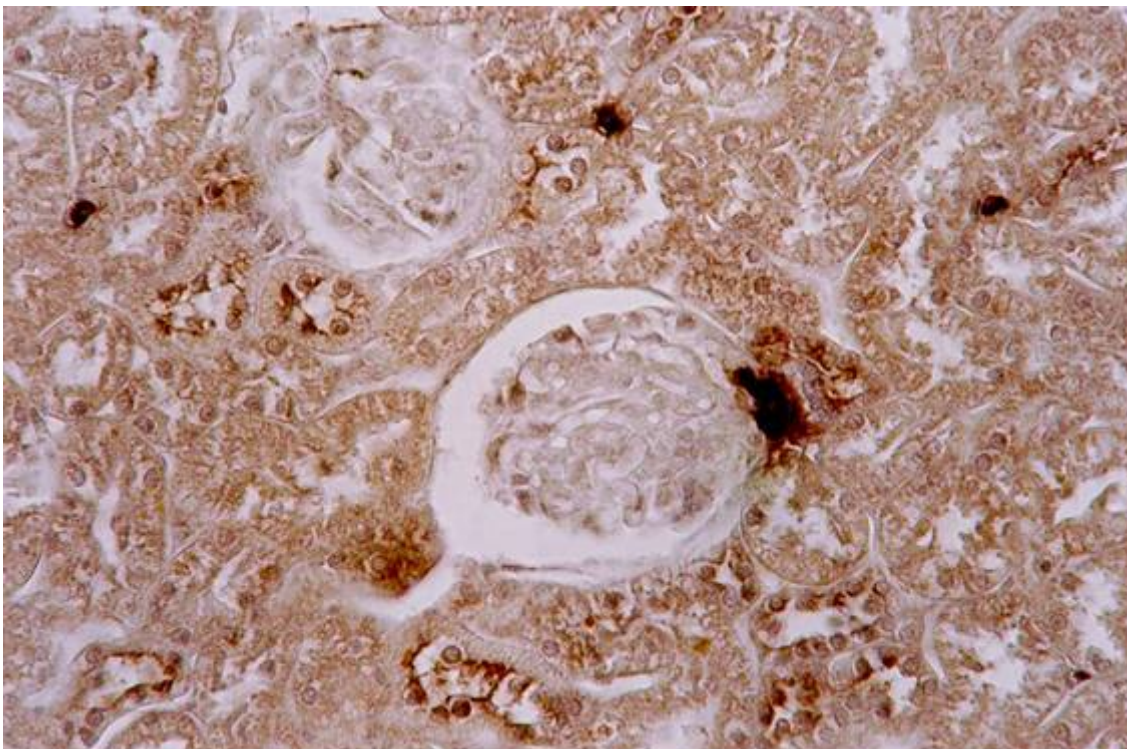


Figura 22. Imuno-localização da All na arteríola aferente no córtex renal de ratas prenhes tratadas com CsA por 20 dias.

3.10. Análise bioquímica e estudo histológico de ratos machos

Após 21 dias de tratamento com a CsA, os ratos machos apresentaram média \pm erro padrão em relação ao peso de 324 ± 4 g, creatinina plasmática (mg/dl) de $0,7 \pm 0,05$ mg/dl; creatinina urinária (mg/dl) de $106 \pm 7,5$ mg/dl; volume de urina após 24 horas de 10 ± 1 ml; concentração de CsA no sangue de 3368 ± 130 ng/ml e análise histológica de $0,66 \pm 0,21$ para fibrose intersticial.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A ciclosporina A (CsA), droga com potente atividade imunossupressora, é bastante utilizada na prática clínica atual⁽⁷⁻¹²⁾ tanto em transplante de órgãos sólidos e de medula óssea, como no controle de doenças auto-imunes. Em consequência, um grande número de indivíduos é exposto a esta droga nos dias atuais. Neste grupo de pessoas, existem mulheres em idade fértil que podem engravidar utilizando a CsA. Os efeitos renais, decorrentes da associação do uso desta droga com as alterações hemodinâmicas observadas na gravidez são pouco conhecidos.

O uso da CsA na gravidez e no período pós-natal deve ser realizada com cautela.^(72,73) Pacientes que receberam transplante renal e desenvolveram gravidez, podem apresentar infecções oportunistas, hipertensão arterial, infecções urinárias, anemia,^(74,75) diabetes gestacional.⁽⁷⁶⁾ Felizmente, vários autores relatam que o uso de drogas imunossupressoras como a CsA, não aumenta a chance de anomalias congênitas,⁽⁷⁴⁾ não é um fator teratogênico,^(77,78) porém, apresentando casos de partos prematuros,^(73,75,76,78-80) sendo necessários mais estudos para o estabelecimento de riscos para a mãe e para o feto em desenvolvimento.^(78,73) Clinicamente, o uso da CsA após transplante e durante a gravidez não altera a função do órgão transplantado não afetando a função renal.^(66,74-76,79)

Vários autores relatam que apesar do uso de drogas imunossupressoras, como a CsA em mulheres grávidas, 80% dessas pacientes tem sucesso na gravidez⁽⁷⁴⁾ com o nascimento de crianças saudáveis.^{(73,75,76,79-}

81) Portanto, a utilização de doses terapêuticas, monitoramento e acompanhamento médico, tornam viável o uso da CsA durante a gravidez, no entanto, mais pesquisas devem ser realizadas para melhor esclarecimento sobre o uso dessas drogas.^(73,78)

Os resultados observados na metade do período gestacional demonstraram que nas ratas prenhes tratadas com veículo, ocorreu aumento significativo da filtração glomerular da ordem de 27%. Este aumento associa-se à vasodilatação renal causada pela prenhez com o conseqüente aumento da filtração glomerular. A gravidez determina alterações na hemodinâmica renal, aumento na produção de renina, do angiotensinogênio, da angiotensina, da aldosterona, das prostaglandinas, de progesterona e da gonadotropina coriônica.⁽⁵²⁾ A gravidez normal em humanos e animais é caracterizada por aumento no débito cardíaco e no volume sanguíneo, assim como, diminuição na pressão arterial devido à redução na resistência periférica, a fim de proporcionar um meio ambiente apropriado para o desenvolvimento fetal.⁽⁵⁷⁾ No rim ocorre um mecanismo adaptativo caracterizado por vasodilatação renal com redução proporcional das resistências das arteríolas aferente e eferente e conseqüente aumento de cerca de 30 a 60% na filtração glomerular renal e cerca de 45 a 70% no fluxo plasmático renal.^(52,55)

As ratas prenhes tratadas com CsA apresentaram aumento menor na filtração glomerular, não significativa em relação às ratas virgens. A ação vasoconstritora causada pela CsA foi provavelmente o fator que prejudicou o aumento fisiológico da filtração glomerular determinado pela prenhez. A nefrotoxicidade da CsA é caracterizada por vasoconstricção pré-glomerular e

alterações na hemodinâmica renal.^(31,32) Vários são os possíveis mediadores desta vasoconstrição. O bloqueio isolado destes fatores não protegeu completamente contra a queda da função renal, sugerindo que vários mediadores devam estar envolvidos neste processo. Entre eles são apontados diminuição do óxido nítrico e de prostaglandinas vasodilatadoras, aumento da atividade simpática, formação de radicais livres, liberação do fator ativador plaquetário, aumento da liberação de endotelina, de angiotensina II e de aldosterona.⁽⁴²⁾

O fluxo sanguíneo renal aumentou significativamente na metade do período gestacional nas ratas prenhes tratadas com veículo e nas ratas prenhes tratadas com CsA. Este dado sugere que a CsA tenha agido mais na hemodinâmica glomerular, dificultando o aumento fisiológico da filtração glomerular, porém aparentemente os mecanismos fisiológicos adaptativos da prenhez conseguiram aumentar o fluxo sanguíneo renal das ratas prenhes apesar da ação vasoconstritora da droga CsA.

No final do período gestacional, a ação vasoconstritora renal determinada pelo tratamento com a CsA por 20 dias determinou que a FGR e o FSR dos animais tratados com CsA fosse significativamente menor em relação aos animais tratados com veículo, independentemente do fato de estarem prenhes ou virgens.⁽⁵⁵⁾

A resistência vascular renal caiu significativamente na metade do período gestacional nas ratas prenhes tratadas com veículo e com CsA, quando comparadas às ratas virgens do respectivo tratamento. No final da gestação, os valores não foram significantes quando comparados entre si. A prenhez

ocasionou a redução da resistência vascular renal mesmo com o uso da CsA.⁽⁵⁷⁾

A vasoconstricção causada pelo uso da CsA⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ prejudicou a queda fisiológica da pressão arterial na metade da prenhez.^(52,54,57) Assim, nas ratas prenhes tratadas com veículo esta queda foi de 13% e significativa em relação às virgens. Já nas ratas tratadas com CsA a queda da PA foi de apenas 7%, que não foi estatisticamente significativa em relação às virgens. Após 20 dias, as ratas grávidas também apresentaram valores menores em relação às virgens dos grupos estudados, mas não estatisticamente significantes.

A gravidez causa diminuição fisiológica na resistência vascular periférica, com queda da pressão arterial,^(52,53) o que foi observado no presente trabalho nas ratas que receberam veículo. Os animais que receberam CsA perderam a esta capacidade de vasodilatação, não ocorrendo a queda da pressão arterial. Os possíveis mediadores desse efeito vascular podem ser aumento da atividade simpática,⁽²¹⁾ aumento da liberação renal e sistêmica de endotelina,⁽²²⁾ aumento da produção de tromboxano A₂, redução de prostaglandinas vasodilatadoras e aumento das prostaglandinas vasoconstritoras,⁽²³⁻²⁶⁾ alterações no relaxamento vascular dependente de óxido nítrico,^(27,28) a ativação do sistema renina-angiotensina com o aumento da liberação de angiotensina II, liberação de fator ativador de plaquetas, geração de radicais livres de oxigênio e efeito direto da droga na musculatura lisa vascular.^(29,30) Esta alteração causada pela CsA é provavelmente multifatorial, ocorrendo através de lesão endotelial e de desequilíbrio entre as substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras.⁽²⁰⁾

Durante a gravidez ocorre vasodilatação intra-renal, como fenômeno adaptativo do organismo materno.⁽⁵⁵⁾ Neste estudo, as ratas prenhes que receberam veículo apresentaram aumento na FGR e FSR em relação às virgens. Nas ratas tratadas com CsA (virgens e grávidas), o efeito vasoconstritor causado pela droga na arteríola aferente pode ser inferido pela observação da diminuição do FSR em relação às tratadas com veículo. Entretanto, o aumento do FSR causado pela gravidez permaneceu nas ratas prenhes tratadas com CsA. É possível que os vasos intra-renais tenham sido protegidos por aumento na liberação de substâncias vasodilatadoras como prostaglandinas e óxido nítrico. Por outro lado, a capacidade de aumento do FGR foi prejudicada nas ratas tratadas com ciclosporina, sugerindo que o seu efeito mais importante, pelo menos neste estudo, tenha ocorrido ao nível de contração de células mesangiais.

Nos dois períodos de estudo, tanto na metade da prenhez, como no final do período gestacional, as concentrações de CsA no sangue total das ratas grávidas foram significativamente menores em relação aos valores encontrados para as ratas virgens. Esta diminuição nas concentrações da droga nas ratas prenhes ocorreu provavelmente devido à metabolização fetal, já que a CsA tem a capacidade de passar a barreira placentária, por ser uma substância lipossolúvel.⁽⁶⁵⁻⁶⁸⁾

Estudos experimentais mostram que o óxido nítrico renal está aumentado na prenhez em ratos.⁽⁸²⁾ O óxido nítrico protege contra a deposição de matriz extra-celular.⁽⁴⁹⁾ De fato, as ratas prenhes neste estudo apresentaram

tendência de maior óxido nítrico urinário na metade da prenhez, embora estas diferenças não tenham sido estatisticamente significantes.

O uso crônico da CsA causa fibrose intersticial renal irreversível.⁽⁴¹⁾ Surpreendentemente, as ratas prenhes e virgens apresentaram proteção contra o desenvolvimento de fibrose intersticial. O evento, de proteção do sexo feminino contra o desenvolvimento de fibrose intersticial tem sido relatado em outros modelos experimentais de progressão de doença renal.⁽⁸³⁻⁸⁶⁾ Provavelmente há uma dissociação dos mecanismos que levam às alterações hemodinâmicas glomerulares dos que levam à fibrose intersticial, causadas pelo uso da CsA.^(3,37,38)

No final do período gestacional, as ratas prenhes que receberam veículo apresentaram aumento significativo da expressão de All no interstício renal quando comparadas às ratas virgens que receberam veículo onde a expressão de All está aumentada devido à prenhez que determina o aumento dos componentes do sistema renina-angiotensina.⁽⁵²⁾ A expressão de All no interstício renal foi semelhante para ratas prenhes quando comparadas às ratas virgens que receberam o tratamento com a CsA, provavelmente devido a ativação do sistema renina-angiotensina determinado pelo uso da CsA.^(39-41,52) foi o principal fator que determinou a similaridade entre virgens e prenhes, pois a prenhez aumenta a expressão de All. Quando comparadas ratas prenhes e virgens que receberam veículo em relação às ratas prenhes e virgens que receberam CsA, os valores observados foram significativamente maiores para os animais que receberam o tratamento com CsA, provavelmente pelo uso da

CsA que ativa o sistema renina-angiotensina e conseqüentemente a expressão de All no interstício renal.⁽³⁹⁻⁴¹⁾

O mesmo aconteceu em relação à expressão de All na arteríola aferente, com exceção à comparação das ratas prenhes controle em relação às ratas prenhes tratadas com CsA, onde os valores foram semelhantes, provavelmente na arteríola aferente a expressão de All é semelhante pelo aumento da ação do sistema renina-angiotensina devido ao tratamento com CsA⁽³⁹⁻⁴¹⁾ como também devido a ação adaptativa da prenhez no rim.⁽⁵²⁾

O volume urinário e a depuração osmolar na metade da gravidez, não apresentaram diferenças significativas entre as ratas prenhes em relação às virgens, pois apesar do aumento do volume extracelular nas ratas grávidas, o rim possibilitou ajuste na osmorregulação com aumento na concentração de vasopressina, preservando a osmolalidade sérica e a capacidade de concentrar e diluir a urina em resposta à privação ou ingestão de água.⁽⁸⁷⁾

O manejo renal de sódio é importante na gravidez, onde os efeitos natriuréticos da hiperprogesteronemia são contrabalanceados pelos efeitos antinatriuréticos da hiperaldosteronemia. Assim, é estabelecido um novo balanço de sódio, embora o rim permaneça sensível aos efeitos da aldosterona. Durante a gravidez ocorre importante aumento na filtração glomerular normal de sódio, mas a excreção de sódio permanece normal através de reajustes tubulares que garantem a sua homeostase. Este cuidadoso reajuste da manipulação de sódio sutilmente promove lento acúmulo deste íon necessário à gravidez, sem modificar a sua excreção urinária final, ou a capacidade do rim de livrar-se de sobrecargas salinas.⁽⁸⁷⁾ De fato, as ratas

controle prenhes na metade e no final da gestação apresentaram significativo aumento na excreção de sódio urinário em relação às virgens.

O uso do modelo de nefrotoxicidade crônica por CsA em ratos através da manobra de restrição de sal na dieta, utilizando doses da droga próximas às utilizadas em pacientes, proporcionou o bom desenvolvimento do nosso trabalho experimental.⁽³⁵⁾

Após 10 dias, não houve diferença entre as médias dos pesos no dia do experimento para os quatro grupos de estudo. Após 20 dias houve aumento significativo no peso médio dos animais que desenvolveram prenhez em relação às ratas virgens. O peso médio dos animais controle foi maior em relação aos animais que receberam CsA, sendo estatisticamente significativa para os animais que desenvolveram prenhez. A análise do ganho de peso diário mostrou que as ratas prenhes ganharam mais peso que as ratas virgens e que as ratas que receberam controle e apresentaram prenhez (G/C) ganharam mais peso que as ratas prenhes que receberam CsA (G/CsA). Estes dados mostram o habitual ganho de peso durante a prenhez e também confirmam a toxicidade causada pela CsA.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A gravidez não piorou a fibrose intersticial causada pela CsA.

O uso da ciclosporina A na metade da gravidez alterou desfavoravelmente a hemodinâmica renal, determinada por uma adaptação renal frente à gravidez, prejudicando o aumento da filtração glomerular renal e a queda da pressão arterial, mesmo com a queda da resistência vascular renal.

O uso da CsA causou o aumento da expressão da All no interstício renal e na arteríola aferente, principalmente no final do período gestacional.

A concentração sanguínea de CsA na metade e no final da gestação das ratas foi menor em relação às ratas virgens, provavelmente devido à metabolização fetal. Mesmo assim a CsA alterou desfavoravelmente a hemodinâmica renal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calabresi P, Parks Jr RE. Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. In: Goodman LS, Gilman AG, Editores. As bases farmacológicas da terapêutica. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1987. p. 817-856.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Editores. Farmacologia. 3^aed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997. p.206-207
3. Vieira Jr JM, Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* 1999; 68:1746-53.
4. Borel JF. Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 1976; 31:631-41.
5. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animal. *Immunology* 1977; 32:1017-25.
6. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Lewis CC, Patrick GH, Anjana R. Affinity driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than ciclosporine A . *Science* 1999; 285:2129-2133.

7. Cattran DC, Greenwo DC, Ritchie S, Bernstein K, Churchil DN, Clark WF, *et al.* Controlled trial of cyclosporine in patients with progressive membranous nephropathy. Canadian glomerulonephritis study group. *Kidney Int* 1995; 47:1130-35.
8. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 1993; 45:953-1040.
9. Gregory MJ, Smoyer WE, Sedman A, Kershaw DB, Valentini RP, Johson K, *et al.* Long-term cyclosporine therapy for pediatric nephrotic syndrome: a clinical and histologic analysis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:543-49.
10. Habib R, Niaudet P. Comparison between pre- and post treatment renal biopsies in children receiving ciclosporine for idiopathic nephrosis. *Clin Nephrol* 1994; 42:141-46.
11. Palestine AG, Austin HA, Balow JE, Antonovych TT, Sabnis SG, Pneuss HG, *et al.* Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N Engl J Med* 1986; 314:1293-98.
12. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E, *et al.* Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1995; 48(2):439-48.

13. Benigni A, Chiabrando C, Piccineli A, Perico N, Gavinelli M, Furci L, *et al.* Increased urinary excretion of thromboxane B2 and 2,3-dinor-TxB2 in cyclosporin A nephrotoxicity. *Kidney Int* 1998; 34:164-74.
14. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroyh M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984; 311:699-705.
15. Devarajan P, Kaskel FJ, Arbeit LA, Moore LC. Cyclosporine nephrotoxicity: blood volume, sodium conservation and renal hemodynamics. *Am J Physiol* 1989; 256:F71-F78.
16. English J, Evan A, Houehton DC, Bennett WM. Cyclosporine induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 1987; 44:135-41.
17. Lanese DM, Falk AS, Conger JD. Sequential agonist activation and site specific mediation of acute cyclosporine constriction in rat renal arterioles. *Transplantation* 1994; 58:1371-78.
18. Sabbatini M, De-Nicola L, Uccelo F, Romano G, Papaccio G, Fuiano G. Medium-term cyclosporine renal dysfunction and its reversibility in rats. *Am J Physiol* 1991; 260:F898-F905.

19. Potier M, Wolf A, Cambar J. Comparative study of cyclosporine A, cyclosporine G, and the novel cyclosporine derivative IMM 125 in isolated glomeruli and cultured rat mesangial cells: A morphometric analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:1406-1411.
20. Vieira Jr JM, Burdmann EA. Nefrotoxicidade por ciclosporina. In: Cruz J, Barros RT, editores. *Atualidades em Nefrologia 4*. São Paulo: Sarvier; 1996. p.291-300.
21. Lyson T, McMullan DM, Ermel LD, Morgan BJ, Victor RG. Mechanism of cyclosporine-induced sympathetic activation and acute hypertension in rats. *Hypertension* 1994; 23:667-75.
22. Klintman G, Althoff P, Apleby G, Segerbrandt E. renal function in a newborn baby delivered of a renal transplant patient taking cyclosporine. *Transplantation* 1984; 38(2):198.
23. Bennett WM, Burdmann EA, Andoh TF, Houghton DC, Lindsley J, Elzinga LW. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:141-45.
24. Coffman TM, Carr DR, Yarger WE, Klotman PE. Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1987; 43:282-85.

25. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzi G. Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Physiol* 1986; 251:F581-F587.
26. Smeeters C, Chaland P, Giroux L, Moutquin JM, Etienne P, Douglas F, *et al.* Prevention of acute cyclosporine A nephrotoxicity by a thromboxane synthetase inhibitor. *Transplant Proc* 1988; 20:658-64..
27. Assis SM, Monteiro JL, Seguro AC. L-Arginine and allopurinol protect against cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1997; 63:1070-73.
28. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, Lopez P, Mendoza S, Garcia-Torres R, Alvarado JÁ, Herrera-Acosta J. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1994; 46:773-79.
29. Burdmann EA, Yu L, Andoh TF, Perico N, Bennett WM. Nephrotoxicity of calcineurin inhibitors. In: De Broe ME, Porter GA, Bennett WM, Verpooten GA, editores. *Clinical Nephrotoxins*. 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers; 2002.
30. Burdmann EA, Vieira Jr JM, Vidal EC. Nefropatia crônica e túbulo intersticial. In: Riella MC, Editores. *Princípios de nefrologia e distúrbios eletrolíticos*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2003. p, 466-69.

31. Griffiths MH, Crowe AV, Papadaki L, Banner NR, Yacoub MH, Thompson FD, *et al.* Cyclosporin nephrotoxicity in heart and lung transplant patients. *Q J Med* 1996; 89:751-63.
32. Myers BD, Newton L. Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:S45-S52.
33. Bennett WM, De Mattos A, Meyer MM, Andohn T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: The Achilles heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996; 50:1089-1100.
34. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1995; 48:S63-S69.
35. Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol* 1993; 2:214-21.
36. Hamahira K, Lijima K, Tanaka R, Nakamura H, Yoshikawa N. Recovery from cyclosporine-associated arteriolopathy in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrology* 2001; 16:723-727.
37. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, *et al.* Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol* 1995; 269(4 Pt 2):F491-9.

38. Yong EW, Ellis CN, Messana JM, Johnson KJ, Leichtman AB, Mihatsch MJ, *et al.* Prospective study of renal structure and function in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Kidney Int* 1994; 46:1216-22..
39. Gardiner DS, Watson MA, Junor BJ, Briggs JD, Moore IA, Lindop G. The effect of conversion from cyclosporine to azathioprine on renin-containing cells in renal allograft biopsies. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6:363-367.
40. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997; 52:1497-1510.
41. Zhuo J, Alcorn D, Allen AM, Mendelsohn FAO. High-resolution localization of angiotensin II receptors in rat renal medulla. *Kidney Int* 1992; 42:1372-1380.
42. Burdmann EA, Takeshi FA, Yu L, Bennetti WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Seminars Nephrology* 2003; 23(5):465-476.
43. Feria I, Pichardo I, Juárez P, Ramirez V, González MA, Uribe N, *et al.* Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003; 63:43-52.
44. Cubaci B, Kumar MS, Bloom RD, Pratt B, Haussman G, Laskow DA, *et al.* Transforming growth factor-beta levels in human allograft chronic fibrosis

- correlate with rate of decline in renal function. *Transplantation* 1999; 68:785-790.
45. Islam M, Burke JF Jr, McGrowen TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, *et al.* Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine induced renal dysfunction. *Kidney Int* 2001; 59:498-506.
46. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Jhonson RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 2001; 59:1626-1640.
47. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Morigu K, *et al.* Up regulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hyperextension* 1999; 17:537-545.
48. Li C, Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Park CW, Park JH, *et al.* Colchicine suppresses osteopontin expression and inflammatory cell infiltration in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Nephron* 2002; 92:422-430.
49. Andoh TF, Gardner MP, Bennetti WM. Protective effects of dietary L-arginine supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1997; 64:1236-1240.

50. Watanabe C, Amodeo C, Andrade J, Sousa JEMR. Pregnancy in patients after renal transplantation. Disponível na Internet <http://www.moreirajr.com.br/RBM/espjun99/rbmgravi.htm>. 07/2000.
51. Kusnetzoff D, Avedãno G, Lombroni J, Giniger R, Veja RH, Barata AD. Pregnancy in the renal transplant patient. Rev Soc Obstetr Ginecol 1995; 74(916):263-72.
52. Paller MS. The kidney and hypertension in pregnancy. In: Brenner BM, Editor. Pathogenesis of renal disease. The Kidney Pennsylvania: WB Saunders Company; 2000. P.1621-1655.
53. Rubistein I. Aspectos da Fisiologia Renal na gravidez. In: Benzecry R, Oliveira HC, Lemeruber I, Editores. Tratado de Obstetrícia. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p 68-71.
54. Rezende J, Coslovsky S. Repercussões da gravidez sobre o organismo. In: Rezende J, Editor. Obstetrícia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. P.135-152.
55. Boim MA, Schor N. Rim e gravidez. In: Ajzen H, Schor N. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar: nefrologia. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2000. p.313-5

56. Novak J, Danielson LA, Kerchner LJ, Sherwood OD, Ramirez RJ, Moalli PA, *et al.* Relaxin is essential for renal vasodilatation during pregnancy in conscious rats. *J Clin Invest* 2001; 107(11):1469-1475.
57. Gangula PRR, Zhao H, Wimalawansa SJ, Supowit SC, DiPette DJ, Yallampalli C. Pregnancy and steroid hormones enhance the systemic and regional hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide in rats. *Biology Reproduct* 2001; 64:1776-83.
58. Rupnow HL, Phernetton TM, Modrick ML, Wiltbank MC, Bird IM, Magness RR. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VIII. Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1 and PGIS protein. *Biology of reproduction* 2002; 66: 468-74
59. Antunes-Rodrigues J, Favaretto ALV. Sistema Reprodutor. In: Aires MM, Editor. *Fisiologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 913.
60. Sherwood OD. Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* 2004; 25(2):205-234.
61. Danielson LA, Conrad KP. Time course and dose response on relaxin-mediated renal vasodilatation, hyperfiltration, and changes in plasma osmolality in conscious rats. *J Appl Physiol* 2003; 95:1509-1514.

62. Conrad KP, Debrah DO, Novak J, Danielson LA, Shroff,SG. Relaxin modifies systemic arterial resistance and compliance in conscious, nonpregnant rats. *Endocrinology* 2004; 7(145):3289-3296.
63. Baccari MC, Calamari F. Relaxin: new functions for an old peptide. *Curr Protein Pept Sci* 2004; 5(1): 9-18.
64. Arundhathi J, Novak J, Danielson LA, Kerchner LJ, Opett SL, Conrad JP. Essential role of vascular gelatinase activity in relaxin-induced renal vasodilatation, hyperfiltration, and reduced myogenic reactivity of small arteries. *Circ Res* 2003; 93(12):1249-1257.
65. Venkaramanan R, Koneru B, Wang CCP, Burckart GJ, Caritis SN, Starzl TE. Cyclosporine and its metabolites in mother and baby. *Transplantation* 1988; 46: 468-469.
66. Burrows DA, O'Neil TJ, Sorrels TL. Successful twin pregnancy after renal transplant maintained on cyclosporine A Immunosuppression. *American College of Obstetricians and Gynecologists* 1988; 72(3):459-461.
67. Kozłowska-Boszko B, Korczak G, Wierzbicki P, Lis K, Gaciong Z, Lao M, *et al.* Pregnancy following kidney transplantation: Risk of offspring. Institute, Marsaw Medical School. *Transplantation* 1997; 29:262-65.

68. Rezzani R, Rodella L, Bianchi R. Cyclosporine and pregnancy in rat. *Transplantation* 1997; 63(1):164-167.
69. Mason RJ, Thomson AW, Whitening PH, Gray ES, Brown PA, Simpson JG. Cyclosporine induced fetotoxicity in the rat. *Transplantation* 1985; 39(1):9.
70. Pickrell MD. Pregnancy after renal transplantation; severe intrauterine growth retardation during treatment with cyclosporine A . *Br Med J* 1988; 396:825.
71. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990; 37: 1487-91.
72. Dor R, Blanshad C. Caution with use of cyclosporin in pregnancy. *Gut* 2003; 52: 159-61.
73. Cardonick E, Moritz M, Armenti V. Pregnancy in patients with organ transplantation: a review. *Obstetr Gynecol Survi* 2004; 59(3):214-22.
74. Hou S. Pregnancy in renal transplant recipients. *Adv Ren Replace Ther* 2003; 10(1):40-7.
75. Coelho JCU, Parolin MB, Matias JEF. Sucessful tWin pregnancy after orthotopic liver transplantation. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(4):246-47.

76. Al-Khader AA, Al-Ghamdi BN, Shaheen F, Hejaili F, Qureshi J. Pregnancies in renal transplant recipients – with focus on the maternal issues. *Ann Transplant* 2004; 9(3): 62-4.
77. Bar J, Stahl B, Hod M, Wittenberg C, Pardo J, Merlob P. Is immunosuppression therapy in renal allograft recipients teratogenic? A single-center experience. *Am J Med Genet A* 2003; 116(1): 31-6.
78. Bar OB, Hackman R, Einarson T, Koren G. Pregnancy outcome after cyclosporine therapy during pregnancy: a meta-analysis. *Tranplantation* 2001; 71(8):1051-5.
79. Basso M, Ghio M, Filaci G, Setti M, Indiveri F. A case of successful pregnancy in a woman with systemic sclerosis treated with cyclosporin. *Rheumatol* 2004; 43(10): 1310-11.
80. Lorenzo M, Bo P, Senzolo M, Cillo U, Naoumov N, Burra P. Successful pregnancy in a liver transplant recipient treated with lamivudine for de novo hepatitis B in the graft. *Tranpl Int* 2005; 17(11): 730-4.
81. Danesi R, Del Tacca M. Teratogenesis and immunosuppressive treatment. *Transpl Proc* 2004; 36(3): 705-7.

82. Alexander BT, Miller MT, Kassab S, Novack J, Reckelholff JF, Kruckeberg WC, *et al.* Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension* 1999; 33[part II]:435-39.
83. Mahmoud M El-Mas, Elham A A, Amal G O, Mahamoud M M El-Din, Fouad MS. Testosterone depletion contributes to cyclosporine-induced chronic impairment of acetylcholine renovascular relaxations. *European J Pharmacol* 2003; 468: 217-24.
84. Antus B, Peter H, Gabor K, Zoltan S, Istvan M, Zoltan N, *et al.* Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:54-61.
85. Duk-Hee K, Eun SY, Kyun-Il Y, Richard J. The impact of gender on progression of renal disease Potential role of estrogen mediated vascular endothelial growth factor regulation and vascular protection. *Am J Pathol* 2004; 164(2): 679-88.
86. Neugarten J. Gender and the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2807-09.
87. Santos OR. Nefropatias. In: Rezende J, Editor. *Obstetrícia*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.449-53.

7. APÊNDICE

Comissão de Ética na
Experimentação Animal

CEEA
FAMERP

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto **FAMERP**
Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA

Após avaliação do projeto intitulado **“Efeito da gravidez sobre a nefrotoxicidade crônica da ciclosporina A (CsA)”** a ser desenvolvido pela aluna de pós-graduação em nível de doutorado Glória Elisa Florido Mendes, sob orientação de Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann, emitimos o seguinte.

PARECER

O projeto é relevante, com metodologia e apresentação adequadas e de grande interesse médico-social. Os autores têm experiência no uso de animais em experimentação, particularmente em modelos experimentais de avaliação do efeito de drogas nefrotóxicas. Isto pode ser comprovado pela análise curricular do orientador. O “n” empregado e os procedimentos descritos para anestesia e a eutanásia dos animais são adequados e visam minimizar o estresse dos animais.

Assim sendo, no atributo de suas funções a CEEA-FAMERP considera o projeto aprovado para execução.

São José do Rio Preto, 25 setembro de 2001.


Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-FAMERP